

JP00/01608

PCT/JP00/01608

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

(4)

12.04.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 8月 6日

REC'D 05 JUN 2000

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第224679号

WIPO

PCT

出願人

Applicant(s):

藤沢薬品工業株式会社

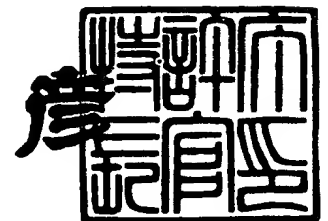
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 5月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3037092

【氏名】 山下 道雄

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区西中島 2-14-10-405

【氏名】 ▲高▼田 葉子

【特許出願人】

【識別番号】 000005245

【氏名又は名称】 藤沢薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島 一

【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9715693

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ソルビトールデヒドロゲナーゼ、それをコードする遺伝子およびそれらの用途

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の理化学的性質を有するソルビトールデヒドロゲナーゼ

。

(a) 作用：D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する

(b) 分子量：約 54 kDa

(c) 補酵素：NAD(P)⁺ 依存性

(d) 基質特異性：ソルビトール、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化し、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールに作用しない

【請求項 2】 グルコノバクター・オキシダンス G624 株由来である請求項 1 記載のソルビトールデヒドロゲナーゼ。

【請求項 3】 請求項 2 記載のソルビトールデヒドロゲナーゼと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするソルビトールデヒドロゲナーゼ。

【請求項 4】 グルコノバクター属に属する細菌由来である請求項 3 記載のソルビトールデヒドロゲナーゼ。

【請求項 5】 以下の(a) または(b) の蛋白質であるソルビトールデヒドロゲナーゼ。

(a) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 上記(a) のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなり、且つ D-ソルビトールを L-ソルボースに変換する反応を触媒する蛋白質

【請求項 6】 請求項 1～5 のいずれかに記載のソルビトールデヒドロゲナーゼをコードする DNA。

【請求項 7】 以下の(a) または(b) の DNA である請求項 6 記載の DNA

。

(a) 配列表配列番号 2 に示される塩基配列中塩基番号 537～1991 で示される塩基配列からなる DNA

(b) 上記(a)の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA

【請求項8】 グルコノバクター属に属する細菌由来である請求項6または7記載のDNA。

【請求項9】 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列からなるDNAおよびその部分DNAとハイブリダイズし得るDNAであって、ソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項10】 請求項9記載の遺伝子によってコードされ、ソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有するグルコノバクター属由来の蛋白質。

【請求項11】 以下の(a)または(b)のDNAからなるプロモーター遺伝子。

(a) 配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1～536で示される塩基配列からなるDNA

(b) 上記(a)の塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物においてプロモーター活性を有するDNA

【請求項12】 請求項6～9のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項13】 請求項6～9のいずれかに記載のDNAを含む発現ベクター。

【請求項14】 ソルボースデヒドロゲナーゼをコードするDNAおよび／またはソルボソンドヒドロゲナーゼをコードするDNAをさらに含む請求項13記載の発現ベクター。

【請求項15】 請求項13または14記載の発現ベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

【請求項16】 大腸菌、シュードモナス属、グルコノバクター属、アセトバクター属およびシュードグルコノバクター属からなる群より選択される属に属する請求項15記載の形質転換体。

【請求項 17】 D-ソルビトールを 2-ケトー-L-グロン酸に変換する能力を有する請求項 15 または 16 記載の形質転換体。

【請求項 18】 請求項 13 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から請求項 1～5 のいずれかに記載のソルビトールデヒドロゲナーゼまたは請求項 10 記載の蛋白質を採取することを含むソルビトールデヒドロゲナーゼ活性を有する蛋白質の製造方法。

【請求項 19】 請求項 13 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に D-ソルビトールを接触させる工程を含む L-ソルボースの製造方法。

【請求項 20】 ソルボースデヒドロゲナーゼをコードする DNA およびソルボソンドヒドロゲナーゼをコードする DNA を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に請求項 19 記載の方法により得られる L-ソルボースを接触させる工程を含む 2-ケトー-L-グロン酸の製造方法。

【請求項 21】 請求項 17 記載の形質転換体を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に D-ソルビトールを接触させる工程を含む 2-ケトー-L-グロン酸の製造方法。

【請求項 22】 請求項 20 または 21 記載の方法により得られる 2-ケトー-L-グロン酸を、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩に変換する工程を含む、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規ソルビトールデヒドロゲナーゼ（本発明において、ソルビトールデヒドロゲナーゼとは D-ソルビトールを酸化して L-ソルボースに変換する反応を触媒し得る酵素を意味するものとする；以下、SLDH という）、それをコードする遺伝子、該遺伝子を用いた遺伝子操作による L-ソルボースおよび 2-ケトー-L-グロン酸（以下、2KLGA という）の製造方法、並びにそれらの

製造に関わる発現系に関する。また、本発明は上記方法により得られる 2 K L G A を利用した L-アスコルビン酸またはその塩の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

L-ソルボースはライヒシュタイン法による L-アスコルビン酸（ビタミン C）合成における重要な中間体である（図 1 を参照）。D-ソルビトールを化学的に酸化すると生成物の約半分が D-ソルボースになるのに対し、S L D H 活性を有する微生物に D-ソルビトールを接触させると約 95% の収率で L 体のみが得られることから、D-ソルビトールを L-ソルボースに変換する工程には従来より発酵法が用いられてきた。

【0003】

一方、2 K L G A は、工業的には L-ソルボースを化学的に酸化することにより合成されている。L-ソルボースデヒドロゲナーゼ（S D H）および L-ソルボソンドヒドロゲナーゼ（S N D H）による 2 段階の酵素的酸化反応を経由して L-ソルボースを 2 K L G A に変換する微生物が知られてはいるが、いずれも 2 K L G A の生産量が低いのが現状である。

【0004】

発酵法によって 2 K L G A を従来よりも効率よく生成させ得る方法として、S L D H 遺伝子を単離し、これを S D H および S N D H 活性を有する微生物に導入することにより D-ソルビトールから 2 K L G A を合成することができる組換え微生物を作製し、該微生物に D-ソルビトールを接触させる方法が考えられる。

【0005】

これまでにいくつかのタイプの S L D H が単離されている [Agric. Biol. Chem., 46(1), 135-141 (1982); Biokhimiia, 43(6), 1067-1078 (1978); J. Biol. Chem., 224, 323 (1957); J. Biol. Chem., 226, 301 (1957); J. Bacteriol., 71, 737 (1956)]。本発明者らはすでに、グルコノバクター・オキシダンス（*Gluconobacter oxydans*）に属する菌株から、膜結合型で大小 2 つのサブユニットからなり、さらにチトクローム c 様ポリペプチドと結合して作用する S L D H をコードする遺伝子を単離している（特願平 9-285280 号）。しかしなが

ら、他のタイプのSLDH遺伝子のクローニングについては、これまで報告がなされていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明の目的は、2KLGAの発酵生産に有用な新規SLDH遺伝子を提供することであり、また、該遺伝子で形質転換された宿主微生物、特にSDHおよびSNDH活性をすでに有する宿主に該遺伝子を導入した形質転換体、あるいはSDH遺伝子およびSNDH遺伝子とともに該遺伝子を導入した形質転換体を提供することである。さらに、本発明の目的は、該微生物を用いてD-ソルビトールからL-ソルボースまたは2KLGAを製造する方法を提供することである。また、本発明の別の目的は、該SLDH遺伝子で形質転換された宿主微生物の培養による組換えSLDHの製造方法並びに該SLDHを用いた酵素法によるL-ソルボースの製造方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、SLDH活性を有するグルコノバクター属の菌株の染色体DNAライブラリーから、該酵素のコード領域を含むDNAをクローニングすることに成功した。シーケンスの結果、該DNAは本発明者らが以前に単離したSLDH遺伝子とは全く異なる、新規なSLDH遺伝子を含むことが確認された。さらに、本発明者らは該DNAを含む発現ベクターでシュードモナスを形質転換し、該組換えシュードモナスの培養物から組換えSLDHを精製することに成功した。また、該DNAを含む発現ベクターで形質転換されたシュードモナスを、SDH遺伝子およびSNDH遺伝子を含む発現ベクターでさらに形質転換し、該形質転換体の培養物を用いてD-ソルビトールを2KLGAに効率よく変換することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は以下に示す通りである。

(1) 下記の理化学的性質を有するSLDH。

- (a) 作用：D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する
- (b) 分子量：約 5 4 k D a
- (c) 補酵素：N A D (P) ⁺ 依存性
- (d) 基質特異性：ソルビトール、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化し、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールに作用しない
- (2) グルコノバクター・オキシダンス G 6 2 4 株由来である上記 (1) の S L D H。
- (3) 上記 (2) 記載の S L D H と分子進化上、同一の遺伝子を起源とする S L D H。
- (4) グルコノバクター属に属する細菌由来である上記 (3) 記載の S L D H。
- (5) 以下の(a) または(b) の蛋白質である S L D H。
 - (a) 配列表配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質
 - (b) 上記(a) のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなり、且つD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する蛋白質
- (6) 上記 (1) ~ (5) のいずれかの S L D H をコードする D N A。
- (7) 以下の(a) または(b) の D N A である上記 (6) の D N A。
 - (a) 配列表配列番号 2 に示される塩基配列中塩基番号 5 3 7 ~ 1 9 9 1 で示される塩基配列からなる D N A
 - (b) 上記(a) の塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る D N A
- (8) グルコノバクター属に属する細菌由来である上記 (6) または (7) の D N A。
- (9) 配列表配列番号 2 に示される塩基配列中塩基番号 5 3 7 ~ 1 9 9 1 で示される塩基配列からなる D N A およびその部分 D N A とハイブリダイズし得る D N A であって、S L D H 活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
- (10) 上記 (9) の遺伝子によってコードされ、S L D H 活性を有するグルコノバクター属由来の蛋白質。
- (11) 以下の(a) または(b) の D N A からなるプロモーター遺伝子。

(a) 配列表配列番号 2 に示される塩基配列中塩基番号 1 ~ 5 3 6 で示される塩基配列からなる DNA

(b) 上記 (a) の塩基配列において、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも 1 種の微生物においてプロモーター活性を有する DNA

(1 2) 上記 (6) ~ (9) のいずれかの DNA を含む組換えベクター。

(1 3) 上記 (6) ~ (9) のいずれかの DNA を含む発現ベクター。

(1 4) SDH をコードする DNA および / または SNDH をコードする DNA をさらに含む上記 (1 3) の発現ベクター。

(1 5) 上記 (1 3) または (1 4) の発現ベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

(1 6) 大腸菌、シュードモナス属、グルコノバクター属、アセトバクター属およびシュードグルコノバクター属からなる群より選択される属に属する上記 (1 5) の形質転換体。

(1 7) 該形質転換体が D-ソルビトールを 2 K L G A に変換する能力を有するものである上記 (1 5) または (1 6) の形質転換体。

(1 8) 上記 (1 3) の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から上記 (1) ~ (5) および (1 0) のいずれかの S L D H 活性を有する蛋白質を採取することを含む該蛋白質の製造方法。

(1 9) 上記 (1 3) の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に D-ソルビトールを接触させる工程を含む L-ソルボースの製造方法。

(2 0) SDH をコードする DNA および SNDH をコードする DNA を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に上記 (1 9) の方法により得られる L-ソルボースを接触させる工程を含む 2 K L G A の製造方法。

(2 1) 上記 (1 7) の形質転換体を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に D-ソルビトールを接触させる工程を含む 2 K L G A の製造方法。

(2 2) 上記 (2 0) または (2 1) の方法により得られる 2 K L G A を、L-

アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩に変換する工程を含む、L-アスコルビン酸またはそのアルカリ金属塩もしくはアルカリ土類金属塩の製造方法。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明のSLDHは、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒する、分子量約54 kDaの蛋白質であり、補酵素としてNADP⁺ またはNAD⁺ を要求することを特徴とする。本酵素はソルビトール他、マンニトール、アラビトールを特異的に酸化することができるが、キシリトール、リビトール、イノシトール、グリセロールには作用しない。

【0010】

本発明のSLDHは、上記の特徴を有する限りその由来に特に制限はなく、天然に存在する生物起源のもの他、自然もしくは人工の突然変異体、あるいは異種、すなわち外来のSLDH遺伝子を導入して得られる形質転換体由来のものもすべて包含される。好ましくは酢酸菌、特にグルコノバクター属に属する細菌、より好ましくはグルコノバクター・オキシダンス、就中グルコノバクター・オキシダンスG624株(FERM BP-4415; 国際出願公開WO95/23220号公報)由来のSLDHが例示される。また、別の好ましい態様においては、本発明のSLDHは、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと分子進化上、同一の遺伝子を起源とするSLDHである。ここで、「分子進化上、同一の遺伝子を起源とする」とは、そのDNA配列分析、生理学的役割等の解析により、分子進化上、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと同一の遺伝子を起源として進化してきたと合理的に判断されるSLDHをいい、これらはDNA配列上、高度な相同性を保持している。これらのSLDHは、好ましくは、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと、DNA配列において60%以上、最も好ましくは80%以上の相同性を示すものである。これらは、後で詳述するように、配列表配列番号2に示されるDNA配列をもとに、適当なプライマーを用いてPCR法により、あるいは適当なプローブを用いてハイブリダイゼーション法によりその遺伝子をクローニングすることができる。

【0011】

さらに好ましい態様においては、本発明のSLDHは配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質、またはSLDH活性を損なわない範囲で、該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質である。

【0012】

本発明のSLDHは、(1) 該酵素を産生する細胞または組織の培養物を原料として単離精製する方法、(2) 化学的に合成する方法または(3) 遺伝子組換え技術によりSLDHを発現するように操作された細胞から精製する方法等を適宜用いることによって取得することができる。

【0013】

天然のSLDH産生細胞からのSLDHの単離精製は、例えば以下のようにして行うことができる。すなわち、適当な液体培地中で該細胞を培養し、得られる培養物からSLDH活性を含む画分を分離回収する。例えば、該酵素が細胞質に局在する場合（本発明のSLDHはNAD(P)⁺依存性であることから、細胞質に局在することが予測される）、培養物を遠心および／または濾過して菌体を回収後、超音波処理やリゾチーム処理および浸透圧ショック等により該菌体を破砕し、10,000～40,000rpm程度で遠心して上清（可溶性画分）を回収する。目的のSLDHは、得られた可溶性画分から、酵素蛋白質の分離精製に常套的に利用されている分離技術を適宜組み合わせることによって精製することができる。このような分離技術としては、例えば、塩析、溶媒沈澱法等の溶解度の差を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）、SDS-PAGE等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー等の荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性を利用する方法、等電点電気泳動等の等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0014】

化学合成による本発明のSLDHの製造は、例えば配列表配列番号1に示され

るアミノ酸配列を基にして、各配列の全部または一部をペプチド合成機を用いて合成し、得られるポリペプチドを適当な再生条件下で再生 (renaturation) させることにより行うことができる。

【0015】

しかしながら、本発明の一実施態様であるG. オキシダンスG 6 2 4 由来のS LDHは、非生理学的な条件において非常に不安定な酵素であるため、上記の方法では精製の途中で酵素が失活する場合がある。このような酵素は、ヒスチジントグ法、GST法等の、特定物質にアフィニティーのある付加・改変配列を利用したアフィニティークロマトグラフィーで素早く精製することができる。したがって、本発明のS LDHの特に好ましい取得方法は、以下に詳述するように、該酵素を有する細胞のDNAから該酵素をコードするDNAをクローニングし、さらに遺伝子操作により、金属イオンキレートに吸着し得るアミノ酸配列をコードする核酸配列を該DNAに付加する工程を含むものである。

【0016】

酵素遺伝子のクローニングは、通常、以下の方法により行われる。まず、所望の酵素を産生する細胞または組織より、該酵素を上記のような手段により完全または部分精製し、N末端アミノ酸配列をエドマン法により決定する。また、該酵素を配列特異的プロテアーゼで部分分解して得られるオリゴペプチドのアミノ酸配列を同様にエドマン法により決定する。決定された部分アミノ酸配列に対応する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーまたはプローブとして用いて、該酵素を産生する細胞または組織より調製されたRNAまたはDNAからPCR法またはコロニー（もしくはプラーク）ハイブリダイゼーション法によって該酵素をコードするDNAをクローニングする。

【0017】

あるいは、完全または部分精製された酵素の全部または一部を抗原として該酵素に対する抗体を常法にしたがって作製し、該酵素を産生する細胞または組織より調製されたcDNAまたはゲノミックDNAライブラリーから、抗体スクリーニングにより該酵素をコードするDNAをクローニングすることもできる。

【0018】

しかしながら、上記のG. オキシダンスG624由来SLDHのように、不安定で精製が困難な酵素については、その酵素活性をマーカーとして、ゲノミックDNAライブラリーから該酵素の遺伝子をそのプロモーター配列を含む断片としてスクリーニングすることができる。SLDHは、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換するので、生成するL-ソルボースを検出することによりSLDH活性を有するクローンを選択することができる。なお、本法の適用にあたっては、技術的困難を伴う場合が多い。

【0019】

具体的には、まずSLDH活性を有する細胞または組織から染色体DNAを常法により単離し、これを適当な制限酵素で分解して、好ましくは染色体DNA内に多数の制限部位を有する制限酵素で部分分解して、得られる断片を適当なクローニングベクター中に挿入する。クローニングベクターとしては、プラスミドベクター、ファージベクター等が挙げられるが、大きなDNAインサートを収容できて、且つコロニーとして回収できることから、コスミドベクターやシャロミドベクターが好ましい。ファージベクターやコスミドベクター等を用いる場合は、さらにインビトロパッケージングを行って、ゲノミックDNAライブラリーを得る。

【0020】

コスミドライブラリーを用いる場合は、上記のようにして得られるパッケージング液で適当な指示菌、好ましくは高形質転換能を有する大腸菌コンピテント細胞を感染させた後、固形培地上にプレートして培養する。生じた各コロニーを個別にD-ソルビトールを含む液体培地に植菌して培養する。培養終了後、培養上清を回収して、例えば、レゾルシン-塩酸反応 (Cohen, J. Biol. Chem., 201, 71, 1953)、レゾルシン-第二鉄塩-塩酸反応 (Kulka, Biochem. J., 63, 542, 1956) のようなケトヘキソースの呈色反応を用いてSLDH活性を有するクローンの候補を選択する。

【0021】

得られたクローンが実際にSLDH活性を有する（すなわち、D-ソルビトールをL-ソルボースに変換する）ことは、例えば、HPLC等により培養上清中

のソルボースを検出することにより確認される。

【0022】

コスミドクロンのDNAインサートは35～45kbと非常に大きいので、プラスミドへのサブクロニングを容易にするために、予めインサートDNAの非SLDH遺伝子領域の一部を除いて縮小化するのが望ましい。このようなDNAインサートの縮小化方法としては、例えばシャロミドベクター等へのサブクロニングが挙げられる。シャロミドベクターは種々の長さのスペーサーDNAを有するので、コスミドベクターよりも小さな種々の長さのDNAをクローニングできる。本発明においては、例えば、約10～20kbのDNAインサートを収容し得るシャロミドベクターが好ましく使用される。SLDH活性を有するシャロミドクロンは上述の方法により選択することができる。

【0023】

プラスミドベクターへのサブクロニングは、例えば、上記のようにして得られる複数のシャロミドクロンについて制限酵素マッピングを行い、SLDH遺伝子内に制限部位が存在しないことがわかった制限酵素を用いてDNAインサートをさらに縮小化し、同様に制限酵素処理したプラスミドベクターとライゲーションさせることにより行うことができる。

【0024】

上記のストラテジーとは別に、本発明のSLDHをコードするDNAは、PCR法を用いて直接クローニングすることもできる。すなわち、該酵素活性を有する細胞または組織由来のゲノミックDNAまたはcDNA（もしくはmRNA）を鋳型とし、増幅断片がSLDHのコード領域をカバーするような適当なオリゴヌクレオチドの対をプライマーとして用いて、常法に従ってPCRを行うことにより、SLDHのコード領域を含むDNA断片を増幅することができる。このような方法は、配列既知のSLDHと分子進化上、同一の起源を有するSLDH遺伝子のクローニングにおいて特に有用である。例えば、G. オキシダンスG624株由来のSLDHと分子進化上、同一の起源を有すると推定される他の細菌由来のSLDH遺伝子をクローニングする場合、配列表配列番号2に示されるDNA配列に基づいて、該配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列を含

むDNA断片と高度に相同性を有するDNA断片を増幅し得るようなセンスおよびアンチセンスプライマーを構築してPCR法を実施すればよい。一方、目的のSLDHと高度な相同性を有するSLDHのDNA配列が未知の場合でも、例えば、5'上流領域の比較的保存されている幾つかの配列をセンスプライマー、3'下流領域の比較的保存されている幾つかの相補鎖配列をアンチセンスプライマーとして、PCRを行うことにより、該SLDH遺伝子をクローニングすることができる。SLDHの上下流配列が未知の場合、鋳型DNAと使用するプライマーとがある程度のミスマッチを含んでいても結合可能な程度に、アニーリング温度を低く設定する必要がある。したがって、PCR産物は目的のSLDH遺伝子を含む断片の他に、非特異的な増幅断片を含んだ混合物となる可能性がある。この場合、得られた増幅断片を、適当なクローニングベクター（例えば、TAクローニング用のプラスミドベクター等）、あるいは目的の増幅断片がプロモーター領域を含まない場合は、発現ベクターにクローニングし、これで大腸菌などのコンピテント細胞を形質転換して、上述の方法によりSLDH活性を有する形質転換体をスクリーニングすればよい。

【0025】

配列既知のSLDHと分子進化上、同一の起源を有するSLDH遺伝子のクローニングにおいては、さらに別のストラテジーとして、SLDH活性を有する細胞または組織由来のゲノミックDNAまたはcDNA（もしくはmRNA）を鋳型とし、既知DNA配列の全部または一部をプローブとして用いて、サザン法等のハイブリダイゼーション法により、直接クローニングする方法が挙げられる。ハイブリダイゼーションの条件は、DNAの由来により、ストリンジェンシーを適宜変化させて用いることができる。例えば、クローニングしようとする微生物の近縁度合い等から、その条件を、塩基配列において約60%以上の相同性を有する配列のみがハイブリッドを形成する条件、また、約80%以上の相同性を有する配列のみがハイブリッドを形成する条件などに、適宜変化させて用いることができる。

【0026】

上記のようにして得られたDNAインサートの塩基配列は、マキサム・ギルバ

ート法やジデオキシターミネーション法等の公知のシーケンス技術を用いて決定することができる。

【0027】

本発明のSLDHをコードするDNAは、好ましくは、配列表配列番号1に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列（但し、該変異アミノ酸配列からなる蛋白質がD-ソルビトールをL-ソルボースに変換する反応を触媒し得る）をコードするDNAである。さらに好ましくは、本発明のSLDHをコードするDNAは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列から実質的になるDNAである。ここで、「実質的になるDNA」とは、該特定塩基配列からなるDNAに加えて、該特定塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る塩基配列からなり、且つ該特定塩基配列からなるDNAがコードする蛋白質と同様の理化学的性質を有する蛋白質をコードするDNAを意味する。また、ここで「ストリンジェントな条件」とは、塩基配列において約60%以上の相同性を有するDNAがハイブリダイズし得る条件をいう。ストリンジェンシーは、ハイブリダイズ反応や洗浄の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができる。

【0028】

また、別の本発明のDNAは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列およびその部分DNAとハイブリダイズし得る塩基配列からなり、且つSLDH活性を有する蛋白質をコードする遺伝子をも包含する。したがって、該遺伝子によってコードされるSLDH活性を有する蛋白質、特にグルコノバクター属由来である蛋白質もまた、本発明の範囲に包含される。

【0029】

本発明のDNAは、上記のようにしてゲノミックDNAから得られるDNAだけでなく、mRNAから得られるcDNAであっても、あるいは配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号537～1991で示される塩基配列を基にして、化学的に合成されるDNAであってもよい。

【0030】

上記のようにSLDH活性を指標としてゲノミックDNAから得られた、SLDHをコードするDNAは、その5'上流領域にプロモーター遺伝子配列を含んでいる。該プロモーター遺伝子は、好ましくは、配列表配列番号2に示される塩基配列中塩基番号1～536で示される塩基配列、または該塩基配列において、1もしくは数個の塩基が欠失、置換、挿入、付加もしくは修飾された塩基配列からなり、且つ少なくとも1種の微生物においてプロモーター活性を有するDNAである。ここで「微生物」としては、細菌（例えば大腸菌、枯草菌、シュードモナス、グルコノバクター、シュードグルコノバクター、アセトバクター等）および放線菌などの原核生物、並びに酵母等の一部の真核生物が好ましく例示される。

【0031】

本発明はまた、本発明のSLDHをコードするDNAを含む組換えベクターを提供する。本発明の組換えベクターは、原核および／または真核細胞の各種宿主細胞内で複製保持または自律増殖できるものであれば特に限定されず、プラスミドベクターおよびファージベクター等が包含される。当該組換えベクターは、簡便には当該分野において入手可能なクローニングベクターまたは発現ベクターに、SLDHをコードするDNAを適当な制限酵素部位を利用して挿入することによって調製することができる。

【0032】

特に、本発明の組換えベクターは、ある宿主細胞内で機能的なプロモーターの制御下にSLDHをコードするDNAが配置された発現ベクターである。使用されるベクターとしては、原核および／または真核細胞の各種宿主細胞内で機能して、その下流に配置された遺伝子の転写を制御し得るプロモーター領域と、該遺伝子の転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有し、該プロモーター領域と該ターミネーター領域とが少なくとも1つの制限酵素認識部位、好ましくはユニークな制限部位を含む配列を介して連結されたものであれば特に制限はないが、形質転換体選択のための選択マーカー遺伝子をさらに含有していることが好ましい。さらに所望により、該発現ベクターは、開始コドンおよび終止コド

ンを、それぞれプロモーター領域の下流およびターミネーター領域の上流に含んでいてもよい。

【 0 0 3 3 】

宿主細胞として細菌を用いる場合、一般に発現ベクターは上記のプロモーター領域およびターミネーター領域に加えて、宿主細胞内で自律複製し得る複製可能単位を含む必要がある。プロモーター領域には、プロモーター、オペレーターおよびShine-Dalgarno (SD) 配列が含まれる。例えば、宿主が大腸菌の場合には、プロモーター領域として *trp* プロモーター、*lac* プロモーター、*recA* プロモーター、*lpp* プロモーター、*tac* プロモーター等が、また、宿主が枯草菌の場合には、プロモーター領域として *SPO1* プロモーター、*SPO2* プロモーター、*penP* プロモーター等が挙げられる。ターミネーター領域としては、通常使用されている天然または合成のターミネーターを用いることができる。また、選択マーカー遺伝子としては、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン等の各種薬剤に対する耐性遺伝子を用いることができる。開始コドンとしては通常 ATG が用いられるが、場合によって GTG を使用することもできる。終止コドンとしては常用の TGA、TAA および TAG が用いられる。

【 0 0 3 4 】

本発明の SLDH をコードする DNA が該酵素を産生する細胞または組織由来のゲノミック DNA から調製され、本来のプロモーターおよびターミネーター領域を含有する形態で得られる場合には、本発明の発現ベクターは、形質転換しようとする宿主細胞内で複製保持または自律増殖できる公知のクローニングベクターの適当な部位に該 DNA を挿入することによって調製することができる。用いられるクローニングベクターとしては、宿主が細菌の場合、大腸菌由来の pBR 系ベクター、pUC 系ベクター等、あるいは枯草菌由来の pUB110、pTP5、pC194 等が例示される。

【 0 0 3 5 】

本発明の SLDH をコードする DNA を含む発現ベクターが、組換え SLDH の製造のために使用される場合、特に該 SLDH が非常に不安定で、通常の精製法では精製途中で酵素が失活する可能性がある場合には、以下のような改変 SL

DHコーディング配列を含む発現ベクターを用いることが特に好ましい。該改変SLDHコーディング配列は、本来のSLDHアミノ酸配列の末端にSLDHの精製を迅速化し得る特定のアミノ酸配列が付加された形態で、SLDHが発現するように、本来のSLDHコーディング配列の末端に該特定アミノ酸配列をコードする塩基配列が付加された配列からなる。SLDHの精製を迅速化し得る特定のアミノ酸配列としては、金属イオンキレートに吸着し得るアミノ酸配列、好ましくはヒスチジン、リジン、アルギニン等の塩基性アミノ酸からなる配列、より好ましくはヒスチジンからなる配列が挙げられる。このような配列はSLDHのアミノ末端またはカルボキシル末端に付加することができるが、カルボキシル末端に付加するのがより好ましい。このような改変SLDHコーディング配列は、本来のSLDHコーディング配列の末端配列と一致する塩基配列に、付加すべきアミノ酸配列をコードする塩基配列を付加してなるオリゴヌクレオチドを合成し、これを一方のプライマーとして用い、SLDH DNAを鋳型としてPCRを行うことにより構築することができる。結果として得られる組換えSLDHは、以下に詳述するように、付加されたアミノ酸配列を吸着させ得る金属イオンキレートを固定化した担体を用いて迅速に単離精製することができる。

【0036】

また、本発明のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターが、2KLG Aの製造のために使用される場合には、当該DNAに加えて、SDHおよび／またはSNDHをコードするDNAを、宿主細胞内で発現し得る形態で含有する発現ベクターを用いることもできる。SLDHをコードするDNA、SDHをコードするDNAおよびSNDHをコードするDNAは、それぞれ別のプロモーターの制御下に置かれてもよく、あるいはそのうちの2つ以上が同一のプロモーターの制御下にタンデムに配置してもよい。

【0037】

本発明の形質転換体は、本発明のSLDHをコードするDNAを含有する組換えベクターで宿主細胞を形質転換することにより調製することができる。宿主細胞は使用する組換えベクターに適合し、形質転換され得るものであれば特に限定されず、当分野で通常使用される天然に存在する細胞あるいは人工的に作製され

た変異体細胞もしくは組換え体細胞など種々の細胞が利用できる。好ましくは細菌、特に大腸菌（例えばDH5 α 、HB101等）、枯草菌、シュードモナス属細菌（例えばシュードモナス・フルオレセンス等）、グルコノバクター属細菌（例えばグルコノバクター・オキシダンス等）、シュードグルコノバクター属細菌、アセトバクター属細菌等である。

【0038】

組換えベクターの宿主細胞への導入は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、宿主が大腸菌や枯草菌等の細菌の場合には、Cohen らの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110 (1972)]、プロトプラスト法[Mol. Gen. Genet., 168: 111 (1979)]、コンピテント法[J. Mol. Biol., 56: 209 (1971)]、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0039】

特に、本発明の形質転換体は、本発明のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞である。該形質転換体がD-ソルビトールから2KLG Aを製造することを目的として作製される場合、宿主細胞はL-ソルボースを2KLG Aに変換する能力を有するものである必要がある。好ましくは、該宿主細胞はSDHおよびSNDH活性を産生する細胞である。天然に存在するこのような細胞としては、例えばグルコノバクター属やアセトバクター属、シュードグルコノバクター属等に属する細菌、具体的にはグルコノバクター・オキシダンスT-100（FERM BP-4415；国際出願公開WO95/23220号公報）等が挙げられる。また、人工的に作製されたこのような細胞としては、上記の天然に存在する細菌等から単離されたSDHおよびSNDHをコードするDNAを機能的に含む発現ベクターで形質転換された細胞、好ましくは大腸菌、シュードモナス属細菌、グルコノバクター属細菌、シュードグルコノバクター属細菌、アセトバクター属細菌等が挙げられる。具体的には、E. coli JM109-pUC19SD5（国際出願公開WO94/20609号公報）、グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-tufB1、グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-trp6、グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-PL1、グルコノバクター・オキシダンス NB6939-pSDH-tac8（以上、国際出願公開WO95/2322

0号公報)等が例示される。

【0040】

また、本発明の形質転換体は、上記のようにSLDHをコードするDNAに加えて、SDHをコードするDNAおよび／またはSNDHをコードするDNAを、宿主細胞内で発現し得る形態で含有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによっても得ることができる。該発現ベクターがSDHをコードするDNAまたはSNDHをコードするDNAのいずれか一方を欠く場合、当該DNAを含む別の発現ベクターとともにコ・トランスフォーメーションすればよい。

【0041】

本発明の組換えSLDHは、上記のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物からSLDHを採取することにより製造することができる。

【0042】

用いられる栄養培地としては、炭素源としてグルコース、フルクトースなどの糖類、グリセロール、好ましくはL-ソルボース、D-ソルビトールを含有するものである。また無機もしくは有機窒素源（例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カゼインの加水分解物、酵母抽出物、ポリペプトン、バクトトリプトン、ビーフ抽出物等）を含んでいてもよい。さらに所望により、他の栄養源〔例えば、無機塩（例えば、二リン酸ナトリウムまたは二リン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム）、ビタミン類（例えば、ビタミンB1）、抗生物質（例えば、アンピシリン、カナマイシン）など〕を培地中に添加してもよい。好ましくは、D-ソルビトール、酵母エキス、 CaCO_3 、グリセロールを組成とする培地である。また、培地の糖（D-ソルビトール）の濃度は、通常1～50%、好ましくは2～40%である。

【0043】

形質転換体の培養は、通常pH5.5～8.5、好適にはpH6～8の条件下、通常18～40℃、好適には20～35℃で5～150時間で行われる。

【0044】

SLDHの精製は、SLDH活性の存在する画分に応じて、通常使用される種

々の分離技術を適宜組み合わせることにより行うことができる。本発明のSLDHはNAD(P)⁺依存性であることから、通常、形質転換体の可溶性画分に局在する可能性が高い。その場合、培養終了後に培養物を濾過もしくは遠心分離して菌体を回収し、超音波処理やリゾチーム処理および浸透圧ショック等によって細胞を破碎して得られる菌体抽出液を用いる。

【0045】

組換えSLDHが、上述のようにその末端に特定のアミノ酸配列を付加された形態で産生される場合、該SLDHは、該特定アミノ酸配列を吸着させ得る金属イオンキレートを固定化した担体を用いたクロマトグラフィー処理（固定化金属アフィニティークロマトグラフィー；IMAC）により、迅速且つ容易に精製することができる。使用される金属イオンキレート吸着体は、遷移金属、例えばコバルト、銅、ニッケル、鉄の二価イオン、あるいは鉄、アルミニウムの三価イオン等、好ましくはコバルトの二価イオン含有溶液を、リガンド、例えばイミノジ酢酸基、ニトリロトリ酢酸基、トリス（カルボキシメチル）エチレンジアミン基等を付着したマトリックスと接触させて該リガンドに結合させることにより調製される。キレート吸着体のマトリックス部は通常の不溶性担体であれば特に限定されない。

【0046】

本発明のL-ソルボースの製造方法は、上記のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物、あるいはSLDH活性が該形質転換体の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液にD-ソルビトールを接触させることにより、L-ソルボースを生成させる。培養物にD-ソルビトールを接触させる方法には、D-ソルビトールを含有する培地中で該形質転換体を培養する方法も包含される。

【0047】

本発明はまた、上記方法により取得されたL-ソルボースを利用した2KLG Aの製造方法を提供する。すなわち、L-ソルボースを2KLG Aに変換し得る宿主細胞、好ましくはSDHをコードするDNAおよびSNDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、適当な培地中で培養し、

得られる培養液、あるいはSDHおよびSNDH活性が該宿主細胞の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液に上記方法により取得されたL-ソルボースを接触させることにより、2KLGAを生成させる。培養物にL-ソルボースを接触させる方法には、L-ソルボースを含有する培地中で該宿主細胞を培養する方法も包含される。

【0048】

本発明の別の2KLGAの製造方法は、上記のSLDHをコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された、L-ソルボースを2KLGAに変換し得る宿主細胞を、適当な培地中で培養し、得られる培養液、あるいはSLDH、SDHおよびSNDH活性が該宿主細胞の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液にD-ソルビトールを接触させることにより、2KLGAを生成させる。培養物にD-ソルビトールを接触させる方法には、D-ソルビトールを含有する培地中で該宿主細胞を培養する方法も包含される。

【0049】

本発明のL-ソルボースの製造方法および2KLGAの製造方法において用いられる培地および培養条件は、上記のSLDHの製造方法において用いられるものと同一であるかもしくは一部が異なるものでよい。

【0050】

また、菌体抽出液にD-ソルビトールまたはL-ソルボースを接触させる場合には、培養終了後の培養物を遠心分離または濾過して菌体を回収し、これを適当な緩衝液、例えば酢酸緩衝液中に懸濁して、超音波処理等により菌体を破碎した後遠心処理して得られる上清を菌体抽出液として使用すればよい。

【0051】

このようにして生産されたL-ソルボースまたは2KLGAは、反応液（D-ソルビトールまたはL-ソルボースを含有する培地中で該形質転換体を培養する場合には培養上清）から一般に用いられる精製方法（例えば、透析、ゲル濾過、適当な吸着材上でのカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなど）を用いて精製することができる。

【0052】

精製された 2KLG A は、従来公知の手段により、L-アスコルビン酸またはその塩（例えば、アルカリ金属もしくはアルカリ土類金属との塩）に変換することができる。このような手段は特に限定されないが、例えば、2KLG A に塩酸などの強酸を加えて加熱する方法が挙げられる。

【0053】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【0054】

実施例 1 SLDH のクローニング

(1) 染色体 DNA の調製

G. オキシダンス G624 株 (FERM BP-4415; WO95/23220 号公報) のシングルコロニーを 2.5% マンニトール、0.3% ポリペプトンおよび 0.5% 酵母エキスからなる培地 (pH 6.0) で 37℃、48 時間培養した。菌体を遠心 (6,000 rpm, 10 分間) により集めて、滅菌水 1 ml に懸濁した。懸濁液を STE 緩衝液 [20% スクロース-50 mM Tris-HCl (pH 8.0)-1 mM EDTA] 1 ml で希釈し、リゾチーム 2 mg を加えた後、37℃ で 30 分間放置した。これに、サルコシル溶液 [1% ラウロイルサルコシレート-100 mM EDTA (pH 8.5)] 2.5 ml とプロテイナーゼ K (終濃度 100 μg/ml) を加え、50℃ で 2 時間放置した。これにセシウムクロライド 5.5 g および 5 mg/ml エチジウムブロミド 0.3 ml を加え、20℃、50,000 rpm で 16 時間超遠心した。染色体 DNA を含む部分を単離し、TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)-1 mM EDTA] 30 ml で溶解した後、5 L の 1 mM EDTA で 2 回透析した。透析液をイソブタノールで 4 回、フェノールで 2 回、クロロフォルムで 3 回洗浄した後、エタノール沈澱により精製した。これを TE 緩衝液 10 ml で溶解し、180 μg/ml の染色体 DNA 溶液を得た。

【0055】

(2) コスミドライブラリーの作製

大腸菌DH1/pcos6EMBL(ATCC 37571;住友ファーマ・インターナショナル(株)経由でATCCより購入)のシングルコロニーを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン含有LB培地[1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1%塩化ナトリウム(pH7.4)]3ml中で37℃、16時間培養した後、その0.5mlを50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン含有LB培地50mlを入れた500ml容三角フラスコに植菌した。37℃で8時間培養した後、遠心(6,000rpm,10分間)により集菌し、QIAGEN Plasmid Midi Kit(QIAGEN社)でコスミドpcos6EMBLを精製した。pcos6EMBL25 μg を50UのBamHIで37℃、2時間消化後、エタノール沈澱により精製した。これを3Uの仔ウシ小腸由来アルカリフォスファターゼ(CIAP)で37℃、1時間脱リン酸処理し、エタノール沈澱により精製した。一方、上記(1)で得られたG.オキシダンスG624株の染色体DNA100 μg を5UのSau3AIで37℃、1分間部分消化後、エタノール沈澱により精製した。該部分消化物約1.5 μg とpcos6EMBLのBamHI消化物約3 μg を、3UのT4DNAリガーゼで4℃、16時間ライゲーションした。このうち3 μl をGIGAPACK II Gold Packaging Extract(STRATAGEN社)でインビトロパッケージングした。このパッケージング液をSMバッファー[50mM Tris-HCl(pH7.5)-100mM NaCl-8mM MgSO₄-0.1%ゼラチン]で50倍希釈し、その25 μl で指示菌(大腸菌XL1-Blue MRA)25 μl を感染させた後、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン含有LBプレートに播き、37℃で1晩放置した。約400個のコロニーが得られたので、約40万クロンのコスミドライブラリーが得られたことになる。

【0056】

(3) SLDH活性を有するクロンのスクリーニング

5%ソルビトールおよび50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンを含有する0.9倍希釈LB培地を1ウェルあたり150 μl 入れた96ウェルプレート丸底(ナルジェ社)で、368個のコスミドクロンを30℃、3日間ゆるやかに振盪培養した。遠心(2,000rpm,10分間)後、培養上清20 μl に0.5mg/mlレゾルシン-エタノール溶液30 μl と0.216mg/ml硫酸鉄(III)ア

アンモニウム-塩酸溶液 $30\ \mu\text{l}$ を加えた後、 80°C で1時間加熱した。培地のみを同様に反応させたものをコントロールとし、コントロールよりも強く褐色を呈した1A4、1A5、4A9の3クローンをソルボース（フラクトース）への変換能を有するクローンとして選択した。これらの培養上清をHPLC〔カラム：Polyspher 0A KC（E. メルク社）、 $7.8 \times 300\text{ mm}$ ；温度：室温；移動相： $0.01\text{ N H}_2\text{SO}_4$ ；流量： 0.4 ml/分 ；検出：RI〕で分析したところ、いずれのクローンもソルボースが検出されたので、これら3クローンをSLDH活性を有するクローンとした。これらコスミドクローンのインサート部分の長さはいずれも約 40 kb であった。

【0057】

（4）シャロミドベクターへのサブクローニング（インサートの縮小化）

SLDH活性を有する 300 ng のコスミドクローン1A4を、 20 mU のSau3AIで 37°C 、1時間部分消化した。また、シャロミド9-28（ニッポンジーン社） $1\ \mu\text{g}$ を4UのBamHIで 37°C 、1時間消化した。この2つの溶液を混合後、エタノール沈澱により精製し、2倍希釈したTE緩衝液 $5\ \mu\text{l}$ で溶解したものを、1UのT4DNAリガーゼで 4°C 、16時間ライゲーションした。このうち $1\ \mu\text{l}$ をGIGAPACK II XL Packaging Extract（STRATAGEN 社）でインビトロパッケージングした。このパッケージング液 $75\ \mu\text{l}$ とSMバッファ $75\ \mu\text{l}$ を混合し、これで指示菌（大腸菌DH-1） $150\ \mu\text{l}$ を感染させた後、 $50\ \mu\text{g/ml}$ アンピシリン含有LBプレートに播き、 37°C で1日インキュベートした。出現したコロニーのうち95個を、5%ソルビトールおよび $50\ \mu\text{g/ml}$ カナマイシンを含有する0.9倍希釈LB培地を1ウェルあたり $150\ \mu\text{l}$ 入れた96ウェルプレート丸底（ナルジェ社）で、 30°C 、3日間ゆるやかに振盪培養した。遠心（ $2,000\text{ rpm}$ 、10分間）後、培養上清 $20\ \mu\text{l}$ に 0.5 mg/ml レゾルシン-エタノール溶液 $30\ \mu\text{l}$ と 0.216 mg/ml 硫酸鉄(III) アンモニウム-塩酸溶液 $30\ \mu\text{l}$ を加えた後、 80°C で1時間加熱した。培地のみを同様に反応させたものをコントロールとし、コントロールよりも強く褐色を呈したG1、C2、A4、B7、H10、B12の6クローンをソルボースへの変換能を有するクローンとした。これらのシャロミドクローンのイン

サート部分の長さはいずれも約 15 kb であった。

【0058】

(5) SLDH 遺伝子のプラスミドベクターへのサブクローニング

これまでに得られたクローンの制限酵素地図から、SLDH 遺伝子には Sac I 部位および Xba I 部位が存在しないことがわかった。そこで、1 μ g のシャロミド B7 を 10 U の Sac I および 10 U の Xba I で消化し、約 6 kb (B7SX3) と約 9 kb (B7SX2) の Sac I-Xba I 断片を得た。この 2 つの断片をそれぞれ大腸菌-シュードモナスシャトルベクター pUCP19 [pUC19 の Nar I 部位に、pRO1614 由来の 1.8 kb の Pst I 断片が挿入されており、大腸菌 DH5 α F' (ATCC 87110) から精製した] に連結した後、シュードモナス (*Pseudomonas*) (その後、本菌株はシュードモナス sp. F-1 と命名された。以下、本命名を用いる。) をエレクトロポレーション法にて形質転換し、Ps. / pUCP19-B7SX3 と Ps. / pUCP19-B7SX2 を得た。コンピテント細胞の調製および形質転換の条件は大腸菌のそれに準じて行った。この 2 クローンをソルビトールを含む培地で培養したところ、Ps. / pUCP19-B7SX2 にソルボースへの変換能が認められた。そこで、Ps. / pUCP19-B7SX2 を、5%ソルビトール、1%バクトトリプトン、0.5%酵母エキス、1%塩化ナトリウム、50 μ g/ml アンピシリンからなる培地 (pH 7.4) で 30 $^{\circ}$ C、4 日間培養したところ、2.4 mg/ml のソルボースが得られた (変換率 5%)。このソルボースを HPLC で分取し、標品との保持時間の一致を確認した。HPLC は上記 (3) と同様の条件にて行った。さらに、GC/MS [カラム: DB-5 (J & W Scientific), 0.32 mm \times 30 m (film 0.25 μ m); 温度: インジェクション = 230 $^{\circ}$ C, カラム = 100 $^{\circ}$ C (5 分) \rightarrow 10 $^{\circ}$ C/分で 10 分間加温 \rightarrow 200 $^{\circ}$ C (5 分) \rightarrow 30 $^{\circ}$ C/分で 1 分間加温 \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (4 分), 検出 = 230 $^{\circ}$ C; 流量: 圧力制御 20 kPa (He)] を用いて、標品とのマスパターンの一致を確認した。

【0059】

(6) SLDH 遺伝子の塩基配列決定

S L D H活性を発現するシュードモナスの形質転換株 P s. / p U C P 19-B 7 S X 2 のプラスミド p U C P 19-B 7 S X 2 のインサート部分の制限酵素地図は図 2 のように推定された。1 μ g の p U C P 19-B 7 S X 2 を 10 U の H i n d III で 37℃、1 時間消化して、約 4 k b の H i n d III-H i n d I II断片を得た。この H i n d III-H i n d I II断片をベクター p U C P 19 に連結し、プラスミド p U C P 19-HC を構築した。そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、P s. / p U C P 19-HC を得た。この形質転換株をソルビトールを含む培地で培養したところ、S L D H活性の発現が認められたので、この H i n d III-H i n d I II断片に S L D H遺伝子の全長が含まれていることがわかった。従って、この約 4 k b の H i n d III-H i n d I II断片の塩基配列を決定することにした。まず、p U C P 19-HC のインサート部分を約 1.1 k b の S p h I-S p h I断片 (S 1)、約 0.8 k b の E c o R I-S p h I断片 (E S) および約 1.3 k b の E c o R I-E c o R I (E 1)断片の 3 つに分け (図 2)、それぞれ p U C 18 にサブクロニングし、p U C 18-S 1、p U C 18-E S および p U C 18-E 1 を得た。

【0060】

プラスミド p U C P 19-HC、p U C 18-S 1、p U C 18-E S および p U C 18-E 1 をテンプレートにして、M 13 シークエンシングプライマーであるユニバーサルプライマーおよびリバースプライマー (New England Labs.) を用いて最初のシークエンシングを行った。なお、サンプルは BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems 社) で蛍光標識し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) で分析した。次に、下に示した 11 種類のプライマーを合成し、p U C P 19-HC をテンプレートにしてシークエンシングを行い、約 4 k b の H i n d III-H i n d I II断片の塩基配列を決定した (配列表配列番号 2)。

【0061】

S L D H遺伝子シークエンス用プライマー

S L 1 GCTGCTGAGTGATCCG (配列表配列番号 3)

S L 2 GACTGCTACTTCGATCC (配列表配列番号 4)

S L 3	CCTACACCTAGCCTGC	(配列表配列番号 5)
S L 4	CAGTGCCGTCATGAGG	(配列表配列番号 6)
S L 5	TCCTGATCTCGGTGCG	(配列表配列番号 7)
S L 6	GATGCTTCAGCACGGC	(配列表配列番号 8)
S L 7	GACGATCACGGAAGGC	(配列表配列番号 9)
S L 8	GGTTACGTGGTCGAGG	(配列表配列番号 1 0)
S L 9	CTATACGTGACAGGTCC	(配列表配列番号 1 1)
S L 1 0	GCGCGATCTGGATACG	(配列表配列番号 1 2)
S L 1 1	CGAGGATCTCGAACGG	(配列表配列番号 1 3)

【 0 0 6 2 】

塩基配列の解析から、1 4 5 5 b p の O R F が見出された (塩基番号 5 3 7 ~ 1 9 9 1) 。したがって、S L D H は 4 8 5 アミノ酸からなり、分子量は約 5 4 k D a であると推定された。また、ホモロジー検索の結果、シュードモナス・フルオレセンスのマンニトールデヒドロゲナーゼと 4 2 % のホモロジーがあることがわかった。

【 0 0 6 3 】

実施例 2 組換え S L D H の製造

(1) ヒスチジン-T a g を有する S L D H (以下、His-tagged SLDH という) を発現するプラスミドの構築

組換え蛋白質を精製するのに、6 × ヒスチジンを利用した T a g システムは非常に簡便な方法である。すなわち、6 つのヒスチジン T a g を持つ蛋白質を発現させ、コバルトやニッケルなどの金属とヒスチジン残基との相互作用を利用して、I M A C により該蛋白質を分離するというものである。まず、S L D H の C 末端側に 6 × H i s を挿入するために、以下に示す 2 対のプライマーをそれぞれ用い、p U C P 1 9 - H C (5 n g) をテンプレートにして、p f u DNA ポリメラーゼ (2 . 5 U) で P C R を行った (9 4 ℃ , 3 0 秒 → 5 5 ℃ , 2 分 → 7 2 ℃ , 2 分 , 2 5 サイクル) 。なお、プライマー (各 2 0 p m o l) は 9 9 ℃ で 4 分間加熱後、急冷したものをを用いた。

【 0 0 6 4 】

PCR 1

プライマー 1 (センス) [SLDH コーディング配列内の N h e I 部位 (下線部) 付近の配列と一致する配列]

CGGATTGCTAGCGATGGC (配列表配列番号 1 4)

プライマー 2 (アンチセンス) [SLDH コーディング配列の 3' 末端と一致する配列、6 × H i s (H)、終止コドン (*) および B a m H I 部位 (下線部) を含む]

ATCGAGGATCC TCA ATGATGATGATGATGATG GGCCGGGATGGCGGC

* H H H H H H (配列表配列番号 1 5)

PCR 2

プライマー 3 (センス) [B a m H I 部位 (下線部) および S L D H 遺伝子の終止コドンの直後の配列と一致する配列を含む]

ATCGAGGATCCATTCGGCTTTTAGGGTAGC (配列表配列番号 1 6)

プライマー 4 (アンチセンス) [SLDH 遺伝子の 3' 非コーディング領域内の B g l II 部位付近の配列と一致する配列および S a c I 部位 (下線部) を含む]

TAGCTGAGCTCATGGGACAGATCTGAGC (配列表配列番号 1 7)

【0 0 6 5】

PCR 1 で特異的に増幅した約 3 6 0 b p の断片を N h e I および B a m H I で消化し、また、PCR 2 で特異的に増幅した約 1 0 0 b p の断片を B a m H I および S a c I で消化した。これとは別に、pUCP19-HC を B g l II および P s t I で消化して得られる約 2 k b の断片を、pUCP19 の B a m H I - P s t I 断片に挿入してインサートの B g l II 部位より下流を除いたプラスミド pUCP19-SLDH を得た (図 3)。これを N h e I と S a c I で消化し、得られる約 6. 2 k b の断片を、上記 2 つの PCR 増幅断片と T4 DNA リガーゼで連結し、pUCP19-SLDH-His を構築した。このプラスミドでシェードモナスを形質転換し、P s. / pUCP19-SLDH-His を得た。

【0 0 6 6】

(2) His-tagged SLDH の精製

形質転換株 P s. / pUCP19-SLDH-His の凍結保存菌体の 1 白金

耳を、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB培地 2ml を入れた 15ml 容遠心チューブ（コーニング社）に植菌し、 30°C で 16 時間培養した。その 1.5ml を 5% ソルビトールと $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含むLB培地 50ml を入れた 500ml 容三角フラスコに植菌し、 25°C で 3 日間培養した。遠心（ $6,000\text{rpm}$ 、 4°C 、 5 分間）により集菌した後、 100mM NaCl 含有 20mM Tris-HCl （ $\text{pH}8.0$ ） 10ml で懸濁した。該懸濁液を超音波破碎装置（トミー社UD-201型）で 5 分間（ 50% インターバル）処理し、遠心（ $15,000\text{rpm}$ 、 4°C 、 10 分間）した後、上清を回収し無細胞抽出液とした。 2ml のTARON樹脂（CLONTECH社）を 15ml 容遠心チューブ（コーニング社）に入れ、 100mM NaCl 含有 20mM Tris-HCl （ $\text{pH}8.0$ ） 10ml で 2 回洗浄して平衡化した。そして、 5ml の上記無細胞抽出液を加え、室温で 20 分間振盪することでHis-tagged SLDHを吸着させた後、 100mM NaCl 含有 20mM Tris-HCl （ $\text{pH}8.0$ ） 10ml で 3 回、 10 分かけて洗浄した。次に、 10mM 、 30mM 、 50mM および 100mM イミダゾールをそれぞれ含有する 100mM NaCl 含有 20mM Tris-HCl （ $\text{pH}8.0$ ） 2ml を順次加え、それぞれ室温で 2 分間振盪してHis-tagged SLDHを溶出した。その結果、 $30\text{mM}\sim 50\text{mM}$ イミダゾール画分にSLDH活性が溶出した。該画分をSDS-PAGE分析したところ、ほぼ単一のバンドが検出された。

【0067】

（3）N末端アミノ酸配列分析

上記（2）で精製したHis-tagged SLDHを、ゲル濃度 12.5% のマルチゲル（第一化学薬品製）を用い、 40mA の電流で 1 時間電気泳動した後、ホライズプロット（アトー社）を用いて、PVDF膜（イモビロンPSQ；ミリポア社）に転写した。膜をクマシーブリリアントブルーG-250で染色した後、約 55kDa のSLDHと思われるバンドをハサミで切り出した。このPVDF膜をプロテインシークエンサーG100A（ヒューレットパッカード社）とPTHアナライザー1090型（ヒューレットパッカード社）でアミノ酸配列分析したところ、SLDH遺伝子のORFから予想されるN末端アミノ酸配列と一致する配列

(MITRETLKSL ; 配列表配列番号18) が得られた。

【0068】

(4) SLDH活性の確認

アプライする無細胞抽出液を10mlとすること、His-tagged SLDH 吸着後の樹脂の洗浄を6回行うこと、並びに50mMイミダゾールおよび100mM NaCl含有20mM Tris-HCl (pH8.0) 5mlでHis-tagged SLDH を溶出させること以外は、上記(2)と同様にしてHis-tagged SLDH を精製した。次いで、得られたHis-tagged SLDH をソルビトールと反応させた時の生成物を分析した。反応液(2ml)組成は、10mM (1.82mg/ml) ソルビトール、0.1Mグリシン/NaOH緩衝液 (pH10.1)、5mM NADP⁺ およびHis-tagged SLDH 0.2ml (41.4μg蛋白)とし、25℃で24時間反応させた。その結果、1.12mg/mlのソルボースが生成した(ソルビトールは0.70mg/ml残存していた;変換率62%)。したがって、コバルトタイプのIMACで精製したHis-tagged SLDH は、ソルビトールを酸化してソルボースを生成するソルビトール脱水素酵素であることが確認された。

【0069】

実施例3 SLDHの特性解析

(1) 補酵素要求性および作用pH範囲

50mM NAD⁺ (またはNADP⁺) 0.1ml、500mM緩衝液0.2ml、実施例2の(4)で調製したHis-tagged SLDH 溶液1.0μl (2.1μg蛋白) および蒸留水0.29mlからなる溶液に、500mMソルビトール0.4mlを添加して反応を開始し(25℃)、NADH (またはNADPH) の増加を分光光度計(UV-2200; 島津製作所)を用いて、340nmにおける吸光度を指標として測定した。pH10.1およびpH9.0の反応液はグリシン/NaOH緩衝液を、pH8.0およびpH7.0の反応液はリン酸カリウム緩衝液をそれぞれ使用した。酵素活性1単位は1分間に1μmolのNADH (またはNADPH) を生成する量と定義した。なお、NAD(P)Hの分子吸光係数は6.3mM⁻¹cm⁻¹とした。また、蛋白量はウシ血清アルブミン(BSA)をスタンダードとして、ローリー法で測定した。その結果、SLDHはNA

D^+ および $NADP^+$ のいずれも補酵素として利用できるが、 $NADP^+$ の方が特異性が高かった。また、該酵素の活性はアルカリ性の pH においてより高かった (表 1)。

【0070】

【表 1】

補酵素	pH	活性 (U/mg 蛋白)
$NADP^+$	10.1	130.2
	9.0	30.0
	8.0	22.9
	7.0	4.2
NAD^+	10.1	8.1
	9.0	3.4
	8.0	1.2
	7.0	0.1

【0071】

(2) 基質特異性

上記 (1) の反応液において、ソルビトールを各種基質で置き換え、また緩衝液をグリシン/NaOH 緩衝液 (pH 10.1)、補酵素を $NADP^+$ とする以外は全く同様にして、SLDH 活性を測定した。その結果、本酵素はソルビトールの他、マンニトール、アラビトールを基質として利用できるが、キシリトール、リビトール、イノシトールおよびグリセロールには作用しなかった (表 2)。

【0072】

【表 2】

基質	活性 (U/mg 蛋白)
ソルビトール	130.2
マンニトール	85.7
アラビトール	88.1
キシリトール	0
リビトール	0
イノシトール	0
グリセロール	0

【0073】

(3) ミカエリス定数

ソルビトールを基質として、上記(2)の方法に従ってSLDH活性を測定したところ、ソルビトールに対する K_m 値は132mM(25℃)であった。

【0074】

実施例4 SNDH/SDH発現ベクターを有するシュードモナス形質転換株の作製および該形質転換株による2KLGA生産性の検討

ルイジアナ州立大学メディカルセンターのKovach博士から供与された広域プラスミドであるpBBR系プラスミド[Gene, 166, 175 (1995)]のうち、pBBR1MCS-2(カナマイシン耐性)およびpBBR1MCS-3(テトラサイクリン耐性)をベクターとして用いて、シュードモナス属株にSNDH/SDH遺伝子を導入し、得られた形質転換体によるL-ソルボースからの2KLGAの発酵生産について検討した。

(1) SNDH/SDH発現広域プラスミドの構築

tufBをプロモーターとするSNDH/SDH遺伝子を含むプラスミドpSDH-tufB1-Eco-d9U(図4)5μgをEcoRI(ベーリンガー・マンハイム社)50Uで37℃、1時間消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動した後、SNDH/SDH遺伝子を含む3.7kbのEcoRI/EcoRI断片をpBBR1MCS-2のEcoRI部位に挿入

した。そのうち、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子と同じ方向に挿入されたプラスミドを pBBR (Km) -SDH · SNDH とした (図5)。

また、tufB をプロモーターとする SNDH / SDH 遺伝子を含むプラスミド pSDH-tufB1 (構築方法は EP 0758679 A1 に記載) 10 μ g を EcoRI (ベーリンガー・マンハイム社) 50 U で 37℃、1 時間消化した後、クレノウフラグメント (ニッポンジーン社) を用いて室温で 30 分間処理して末端を平滑化した。T4 DNA リガーゼ (TOYOBO 社) を用いて該末端に PstI リンカー (GCTGCAGC, TOYOBO 社) を連結した後、PstI (ベーリンガー・マンハイム社) 50 U で 37℃、1 時間消化した。該消化物を 0.8% アガロースゲルで電気泳動して、SNDH / SDH 遺伝子を含む 3.7 kb の PstI / PstI 断片を分取した。この断片を pBBR1MCS-3 の PstI 部位に挿入した。そのうち、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子と同じ方向に挿入されたプラスミドを pBBR (Tc) SDH · SNDH とした (図6)。

【0075】

(2) シュードモナスのコンピテント細胞の調製

シュードモナス sp. F-1 のグリセロール凍結保存菌体を、1% バクトトリプトン (Difco 社)、0.5% 酵母エキス (Difco 社)、1% 塩化ナトリウムからなる L 培地 (pH 7.4) 3 ml を含む 16.5 × 165 mm 試験管に接種し、30℃ で一晩培養した。その培養液全量を L 培地 50 ml を含む 500 ml 容三角フラスコに接種し、25℃ で 6 時間培養した。培養液を遠心して集菌した後、冷却した 10% グリセロール水溶液 30 ml で 2 回洗浄した。洗浄菌体を少量の冷却した 10% グリセロール水溶液で懸濁し、60 μ l ずつ分注した後、液体窒素で瞬間凍結した。

【0076】

(3) シュードモナスの形質転換

液体窒素中で凍結保存されたシュードモナス sp. F-1 のコンピテント細胞を氷水中で解凍した後、上記 (1) で構築した SNDH / SDH 発現広域プラスミド、pBBR (Km) -SDH · SNDH および pBBR (Tc) -SDH · SNDH の溶液それぞれ 1 μ l (約 1 μ g) を加え、4℃ で 30 分間保持した

。これをジーンパルサー遺伝子導入装置（バイオラッド社）を用い、電極間距離が0.1 cmのキュベット中、200 Ω 、1.8 kV、25 μ Fの条件でトランスフォームした後、0.4%グルコースを含むL培地に懸濁し、30℃で1時間振盪した。50 μ g/mlカナマイシンを含むL寒天プレートおよび20 μ g/mlテトラサイクリンを含むL寒天プレートにそれぞれ播き、30℃で2日間培養して、形質転換株Ps. / pBBR (Km) -SDH · SNDHおよびPs. / pBBR (Tc) -SDH · SNDHを取得した。

【0077】

(4) 形質転換株によるソルボースからの2KLGAの発酵生産

上記(3)で得られた形質転換株Ps. / pBBR (Km) -SDH · SNDHおよびPs. / pBBR (Tc) -SDH · SNDHのシングルコロニーを、5 mlのL培地を含む16.5 × 165 mm試験管にそれぞれ接種し、30℃で2日間培養した。その培養液0.5 mlを、5%ソルボース、0.1%グルコース、0.9%バクトトリプトン (Difco社)、0.45%酵母エキス (Difco社)、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウムからなる2KLGA生産用培地 (pH7.4) 10 mlを含む100 ml容三角フラスコに接種し、30℃で5日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸を定量した。ソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸はそれぞれ以下の条件でHPLCにより定量した。

[ソルボース]

カラム: Polyspher OA KC (7.8 mm内径 × 300 mm;

Cica-MERCK)

移動相: 0.01N H₂SO₄

カラム温度: 室温

流速: 0.4 ml/分

検出: 示差屈折計

[ソルボソン (ポストカラムラベリング法)]

カラム: Polyspher OA KC (7.8 mm内径 × 300 mm;

C i c a - M E R C K)

移動相 (ラベル化剤) : 0.04 M塩酸ベンズアミジン

0.25 M亜硫酸カリウム

2 mMホウ酸 / 0.1 N水酸化カリウム

流速 : 0.3 ml / 分

検出 : 蛍光検知器 (励起波長 : 315 nm, 検出波長 405 nm)

[2KLGAおよびL-イドン酸]

カラム : Capcell pak NH2 (4.6 mm内径 × 250 mm ;
資生堂)

移動相 : 30%アセトニトリル, 20 mMリン酸カルシウム (pH 3.0)

流速 : 1.2 ml / 分

検出 : UV-210 nm

その結果、Ps. / pBBR (Km) -SDH・SNDHのソルボースから2KLGAへの変換率は約18%、L-イドン酸への変換率を合わせると約37%であった。また、Ps. / pBBR (Tc) -SDH・SNDHのソルボースから2KLGAへの変換率は約26%、L-イドン酸への変換率を合わせると約47%であった (表3)。

【0078】

【表3】

形質転換株の培養結果 (mg/ml)

形質転換株	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	L-イドン酸
Ps. / pBBR (Km) -SDH・SNDH	12.5 (25.0)	0.3 (0.6)	8.9 (17.8)	9.6 (19.6)
Ps. / pBBR (Tc) -SDH・SNDH	15.6 (31.2)	0.15 (0.3)	13 (26.0)	10.3 (20.6)

括弧内の数値は変換率 (初期ソルボース濃度に対する生成物濃度の%) を表す。

【0079】

比較のために、非形質転換株シュードモナス sp. F-1の2KLGAおよびL-イドン酸生産についても調べた。シュードモナス sp. F-1のグリセロール凍結保存菌体を、5 mlのL培地を含む16.5 × 165 mm試験管に接種し、30℃で1日間培養した。その培養液1 mlを5%ソルボース、0.9%

バクトトリプトン (Difco 社)、0.45% 酵母エキス (Difco 社)、0.9% 塩化ナトリウムからなる培地 (pH 7.4) 10 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに接種し、30℃ で 3 日間培養した。培養液を遠心分離し、同様に培養上清中のソルボース、ソルボソン、2 K L G A および L-イドン酸を定量した。その結果、ソルボースは 5.7 mg/ml と消費されていたが、ソルボソン、2 K L G A および L-イドン酸は検出されなかった。

以上より、2 K L G A および L-イドン酸非生産性のシュードモナス sp. F-1 に S N D H / S D H 遺伝子を導入することにより、ソルボースから 2 K L G A および L-イドン酸を高生産する形質転換株を得ることができた。

【0080】

実施例 5 S N D H / S D H 発現ベクターを有するシュードモナス形質転換株の作製および該形質転換株による 2 K L G A 生産性の検討 (2)

実施例 4 と同様にして、シュードモナス属に属する別の菌株 (シュードモナス I F O 3 3 0 9 株; (財) 発酵研究所 (大阪市淀川区十三本町 2-17-85) より分与を受けた) を宿主として、S N D H / S D H 遺伝子を導入した形質転換株を作製し、該形質転換株における 2 K L G A および L-イドン酸生産性を調べた。

(1) シュードモナス I F O 3 3 0 9 株への S N D H / S D H 遺伝子の導入

シュードモナス I F O 3 3 0 9 株のグリセロール凍結保存菌体を、実施例 4 の (2) と同様の方法で処理し、コンピテント細胞の凍結保存菌体を調製した。液体窒素中で凍結保存された該コンピテント細胞を氷水中で解凍した後、S N D H / S D H 発現広域プラスミドである P s. / p B B R (K m) - S D H · S N D H の溶液 1 μ l (約 1 μ g) を加え、4℃ で 30 分間保持した。これをジーンパルサー遺伝子導入装置 (バイオラッド社) を用い、実施例 4 の (3) と同様の条件で形質転換して、形質転換株 P s. I F O 3 3 0 9 / p B B R (K m) - S D H · S N D H を取得した。

【0081】

(2) 形質転換株における 2 K L G A の発酵生産

上記 (1) で得られた P s. I F O 3 3 0 9 / p B B R (K m) - S D H · S

NDHの1白金耳を、2%ソルビトール、0.5%酵母エキス(Difco社)からなる培地(pH7.0)5mlを含む16.5×165mm試験管に接種し、28℃で1日間培養した。その培養液1mlを5%ソルビトール、0.5%酵母エキス(Difco社)、0.2%ポリペプトン(和光純薬)、0.1% K_2HPO_4 、0.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2% $CaCO_3$ からなる培地(pH7.0)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、28℃で7日間培養した。培養液を遠心分離し、実施例4の(4)と同様にして培養上清中のソルビトール、ソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸を定量した。比較のために、非形質転換株シュードモナスIFO3309株を同じ条件で培養し、培養上清中のソルビトール、ソルボース、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸を定量した。

その結果、非形質転換株では、ソルビトールは0.4mg/mlと消費され、ソルボースは3.9mg/mlと生産していたが、ソルボソン、2KLGAおよびL-イドン酸は検出されなかった。一方、形質転換株Ps. IFO3309/pBBR(Km)-SDH・SNDHでは、1.2mg/mlの2KLGAと、0.5mg/mlのL-イドン酸を生産していた(表4)。すなわち、シュードモナスIFO3309が2KLGAおよびL-イドン酸を生産できない条件下でも、SNDH/SDH遺伝子を該宿主に導入することにより、ソルビトールから2KLGAおよびL-イドン酸を生産する能力が付与されることが確認された。

【0082】

【表4】

形質転換株の培養結果 (mg/ml)				
形質転換株	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	L-イドン酸
Ps. 3309/pBBR(Km)-SDH・SNDH	0.41	1.8	1.2	0.5

【0083】

実施例6 SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを導入したシュードモナス形質転換株による2KLGAの製造

(1) SLDH発現ベクターおよびSNDH/SDH発現ベクターを有するシュ

ードモナス形質転換株の作製

上述のように、pBBR1MCS-2にG. オキシダンスT-100 (FERM BP-4188; EP 0758679 A1) 由来のSNDH/SDH遺伝子を組み込んだ発現ベクターpBBR (Km) -SDH・SNDH (図5) を構築した。実施例1の(5) で得られた組換えシュードモナスPs. /pUCP19-B7SX2に、pBBR (Km) -SDH・SNDHをエレクトロポレーション法を用いて導入し、Ps. /pUCP19-B7SX2+pBBR (Km) -SDH・SNDHを得た。

【0084】

(2) シュードモナス形質転換株による2KLGAの生産

Ps. /pUCP19-B7SX2+pBBR (Km) -SDH・SNDHを、5%ソルビトール、1%バクトトリプトン (Difco 社)、0.5%酵母エキス (Difco 社)、1%塩化ナトリウム、50 μ g/mlアンピシリン、50 μ g/mlカナマイシン、2%軽質炭酸カルシウムからなる培地 (pH7.4) で30℃、4日間培養したところ、1.1mg/mlの2KLGAと1.7mg/mlのイドン酸が得られた。2KLGAについては、HPLCで分取し、標品との保持時間の一致を確認した。さらに、GC/MSを用いて、標品とのマスパターン的一致を確認した。HPLCおよびGC/MSはそれぞれ実施例1の(3) および(5) と同様の条件で行った。

【0085】

実施例7 種々のシュードモナス形質転換株の作製

(1) Ps. /pUCP19-SLDH+pBBR (Km) -SDH・SNDH

実施例2の(1) で構築したpUCP19-SLDHでシュードモナス sp. F-1を形質転換してPs. /pUCP19-SLDHを得た。該組換えシュードモナスにさらにpBBR (Km) -SDH・SNDHを導入して、Ps. /pUCP19-SLDH+pBBR (Km) -SDH・SNDHを得た。

【0086】

(2) Ps. /pUCP19-SLDH-tufB+pBBR (Km) -SDH・SNDH

SLDH遺伝子の開始コドンの上流にSspI部位を導入するために、pUCP19-SLDH (5 μ g) をテンプレートとして、下記プライマー (各20 pmol) 存在下で、pfu DNAポリメラーゼ (2.5U) を用いてPCRを行った (94℃, 30秒→55℃, 2分→72℃, 2分, 25サイクル)。

【0087】

センスプライマー [SspI部位 (下線部) およびSLDHコーディング配列の5'末端と一致する配列を含む]

TAGGAATATTTCTCATGATTACGCGCGAAACCC (配列表配列番号19)

アンチセンスプライマー [SLDHコーディング配列内のEagI部位の下流の配列と一致する配列]

GATGCTTCAGCACGGC (配列表配列番号20)

【0088】

PCRで特異的に増幅した約360bpの断片をSspIとEagIで消化した。また、pUCP19-SLDHをPstIとEagIで消化し、約5.7kbの断片を得た。これら2つの断片とtufBプロモーターを含むPstI-SspI断片 (配列表配列番号21) をT4DNAリガーゼで連結し、pUCP19-SLDH-tufBを構築した。そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、Ps./pUCP19-SLDH-tufBを得た。さらに、SNDH/SDH活性を発現するpBBR (Km) -SDH・SNDHを導入し、Ps./pUCP19-SLDH-tufB+pBBR (Km) -SDH・SNDHを得た。

【0089】

(3) Ps./pUCP19-3DH

5 μ gのpUCP19-SLDH-tufBを40UのKpnIと40UのPstIで37℃、1時間消化し、1.6kb断片を得た。また、1 μ gのpUCP19-SDH・SNDH (pUCP19にG. オキシダンスT-100由来のSNDH/SDH遺伝子を組み込んだ発現ベクター; 図7) を10UのKpnIと10UのPstIで37℃、1時間消化し、8.2kbの断片を得た。これら2つの断片をT4DNAリガーゼで連結し、pUCP19-3DHを構築した。

そして、このプラスミドでシュードモナスを形質転換し、P s. / pUCP19-3DHを得た。

【0090】

実施例8 2KLGAの生産性の検討

組換えシュードモナスによる2KLGAの生産が確認できたので、実施例6および7で得られた4種の形質転換株を用いて、種々の組成の培地での2KLGAの生産性を検討した。

【培養1】

1%バクトトリプトン (Difco 社)、0.5%酵母エキス (Difco 社)、1% NaCl、50 μ g/ml アンピシリン、50 μ g/ml カナマイシンからなる培地 (pH7.4) 2mlを含む15ml容チューブ (ファルコン社) に、P s. / pUCP19-B7SX2+pBBR (Km)-SDH·SNDHの凍結保存菌体の1白金耳を植菌し、30℃で24時間前培養した。前培養液0.5mlを、5%ソルビトール、5%酵母エキス (Difco 社)、0.15% MgSO₄·7H₂O、50 μ g/ml アンピシリン、50 μ g/ml カナマイシン、4%炭酸カルシウムからなる本培養培地 (pH7.0) 10mlを含む100ml容三角フラスコに植菌し、30℃で3日間培養した。

【培養2】

本培養培地の5%酵母エキスを5%カザミノ酸に変えた以外は、【培養1】と同様にして培養した。

【培養3】

本培養培地に1%グリセロールをさらに添加した以外は、【培養1】と同様にして培養した。

【培養4】

生産菌としてP s. / pUCP19-SLDH+pBBR (Km)-SDH·SNDHを用い、本培養培地に5%グリセロールをさらに添加した以外は、【培養1】と同様にして培養した。

【培養5】

生産菌としてP s. / pUCP19-SLDH-tufB+pBBR (Km)

—SDH・SNDHを用い、本培養培地に5%グリセロールを添加した以外は、
[培養1]と同様にして培養した。

[培養6]

生産菌としてPs. /pUCP19-3DHを用い、前培養培地と本培養培地からカナマイシンを除き、さらに本培養培地に5%グリセロールを添加した以外は、[培養1]と同様にして培養した。

各培養におけるソルビトール、ソルボース、ソルボソンおよび2KLGAを定量した。その結果を表5に示す。培地にグリセロールを添加することにより2KLGAへの変換率が向上する傾向が認められた。

[培養7]

本培養培地の酵母エキス濃度を2%とし、さらに5%グリセロールを添加した以外は、[培養1]と同様の条件で、7日間培養した。培養1, 3, 5および7日目におけるソルビトール、ソルボース、ソルボソンおよび2KLGAを定量した。結果を表5に示す。

【0091】

【表5】

培養		ソルビトール	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	イドン酸
1		44. 1	6. 3	0. 1	3. 7	1. 6
2		44. 8	3. 1	0	4. 8	2. 2
3		26. 7	5. 1	0	10. 9	8. 4
4		26. 6	0	0	9. 0	ND
5		26. 6	0	0	10. 7	ND
6		30. 7	5. 2	0	7. 5	ND
7	日数	ソルビトール	ソルボース	ソルボソン	2KLGA	イドン酸
	1	41. 1	0	0	4. 2	ND
	3	25. 6	0	0	10. 6	ND
	5	14. 2	0	0	16. 3	ND
	7	7. 6	0	0	18. 4	15. 5

(単位: mg/ml)

ND: 定量していない

【0092】

実施例9 SLDH発現ベクターおよび/またはSNDH/SDH発現ベクターを導入したシュドモナス・プチーダ形質転換株によるソルボースまたは2KL

GAの発酵生産

以下の実験において、シュードモナス・プチーダIFO3738株のコンピテント細胞の調製および形質転換は、上記シュードモナス sp.F-1と同様に行なった。但し、シュードモナス・プチーダIFO3738株はアンピシリン耐性のため、選択マーカーとしてアンピシリン耐性を用いる場合には、エレクトロポレーション後、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン（通常の10倍量）を含むL寒天プレートに細胞を播き、 30°C で1日培養して、コロニーの大きいものをピックアップすることにより、形質転換体を選択した。

【0093】

(1) SLDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルビトールからのソルボースの発酵生産

シュードモナス・プチーダIFO3738株にSLDH遺伝子(pUCP19-SLDH)を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・プチーダIFO3738/pUCP19-SLDHのシングルコロニーを、5%ソルビトール、0.9%バクトトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウムおよび $500\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンからなるソルボース生産用培地(pH7.4)10mlを含む100ml容三角フラスコに接種し、 30°C で3日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルビトールおよびソルボースを定量した。その結果、 $34.6\text{mg}/\text{ml}$ のソルビトールが残存し、 $7.6\text{mg}/\text{ml}$ のソルボースが生成した。

【0094】

(2) SNDH/SDH発現ベクターを導入した形質転換株によるソルボースからの2KLGAの発酵生産

シュードモナス・プチーダIFO3738にSNDH/SDH遺伝子(pBBR(Km)-SDH-SNDH)を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・プチーダIFO3738/pBBR(Km)-SDH-SNDHのシングルコロニーを、5%ソルボース、0.9%バクトトリプトン(Difco社)、0.45%酵母エキス(Difco社)、0.9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウムおよび $50\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンからなる2KLGA生産用培地(pH

7. 4) 10 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに接種し、30℃で7日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルボース、2 K L G A および イドン酸を定量した。その結果、34. 3 mg/ml のソルボースが残存し、13. 9 mg/ml の 2 K L G A および 3. 5 mg/ml の イドン酸が生成した。

【0095】

(3) S L D H 発現ベクターおよび S N D H / S D H 発現ベクターを導入した形質転換株によるソルビトールからの 2 K L G A の発酵生産

シュードモナス・プチーダ I F O 3 7 3 8 株に S L D H および S N D H / S D H 遺伝子 (p U C P 1 9 - S L D H および p B B R (K m) - S D H · S N D H) を導入した。得られた形質転換株シュードモナス・プチーダ I F O 3 7 3 8 / p U C P 1 9 - S L D H + p B B R (K m) - S D H · S N D H のシングルコロニーを、5%ソルビトール、0. 9%バクトトリプトン (D i f c o 社)、0. 45%酵母エキス (D i f c o 社)、0. 9%塩化ナトリウム、2%炭酸カルシウム、500 μ g/ml アンピシリンおよび 50 μ g/ml カナマイシンからなる 2 K L G A 生産用培地 (p H 7. 4) 10 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに接種し、30℃で7日間培養した。培養液を遠心分離し、培養上清中のソルビトール、ソルボース、2 K L G A および イドン酸を定量した。その結果、35. 6 mg/ml のソルビトールが残存し、13. 2 mg/ml の 2 K L G A および 6. 2 mg/ml の イドン酸が生成した。ソルボースは検出されなかった。

【0096】

【発明の効果】

本発明の S L D H 遺伝子を発現する組換え細胞は、L-ソルボースおよび 2 K L G A の発酵生産のための有用な手段となり得る。ひいては L-アスコルビン酸を簡単且つ大量に製造する上で極めて有用となる。

【0097】

【配列表のフリーテキスト】

配列番号 3 : p U C P 1 9 - H C のインサート DNA のシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 4 : p U C P 1 9 - H C のインサート DNA のシーケンス用プライマー

ーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 5 : pUCP19-HC のインサート DNA のシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 6 : pUCP19-HC のインサート DNA のシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 7 : pUCP19-HC のインサート DNA のシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 8 : pUCP19-HC のインサート DNA のシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 9 : pUCP19-HC のインサート DNA のシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 10 : pUCP19-HC のインサート DNA のシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 11 : pUCP19-HC のインサート DNA のシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 12 : pUCP19-HC のインサート DNA のシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 13 : pUCP19-HC のインサート DNA のシーケンス用プライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 14 : His-tagged SLDH およびプロモーターをコードする DNA 配列を増幅するためのセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 15 : His-tagged SLDH およびプロモーターをコードする DNA 配列を増幅するためのアンチセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 16 : SLDH 遺伝子の 3' 非コーディング領域の DNA 配列を増幅するためのセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 17 : SLDH 遺伝子の 3' 非コーディング領域の DNA 配列を増幅するためのアンチセンスプライマーとして働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 1 8 : S L D H の N 末端アミノ酸配列。

配列番号 1 9 : S L D H コーディング配列の 5' 上流領域に S s p I 制限部位を導入するための P C R プライマー (センス) として働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 2 0 : S L D H コーディング配列の 5' 上流領域に S s p I 制限部位を導入するための P C R プライマー (アンチセンス) として働くべく設計されたオリゴヌクレオチド。

【 0 0 9 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Sorbitol Dehydrogenase, Gene Coding Thereof and Use Thereof

<130> A-4029

<160> 20

<210> 1

<211> 485

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<400> 1

Met Ile Thr Arg Glu Thr Leu Lys Ser Leu Pro Ala Asn Val Gln Ala

1

5

10

15

Pro Pro Tyr Asp Ile Asp Gly Ile Lys Pro Gly Ile Val His Phe Gly

20	25	30
Val Gly Asn Phe Phe Arg Ala His Glu Ala Phe Tyr Val Glu Gln Ile		
35	40	45
Leu Glu His Ala Pro Asp Trp Ala Ile Val Gly Val Gly Leu Thr Gly		
50	55	60
Ser Asp Arg Ser Lys Lys Lys Ala Glu Glu Phe Lys Ala Gln Asp Cys		
65	70	75
Leu Tyr Ser Leu Thr Glu Thr Ala Pro Ser Gly Lys Ser Thr Val Arg		
85	90	95
Val Met Gly Ala Leu Arg Asp Tyr Leu Leu Ala Pro Ala Asp Pro Glu		
100	105	110
Ala Val Leu Lys His Leu Val Asp Pro Ala Ile Arg Ile Val Ser Met		
115	120	125
Thr Ile Thr Glu Gly Gly Tyr Asn Ile Asn Glu Thr Thr Gly Ala Phe		
130	135	140
Asp Leu Glu Asn Ala Ala Val Lys Ala Asp Leu Lys Asn Pro Glu Lys		
145	150	155
Pro Ser Thr Val Phe Gly Tyr Val Val Glu Ala Leu Arg Arg Arg Trp		
165	170	175
Asp Ala Gly Gly Lys Ala Phe Thr Val Met Ser Cys Asp Asn Leu Arg		
180	185	190
His Asn Gly Asn Val Ala Arg Lys Ala Phe Leu Gly Tyr Ala Lys Ala		
195	200	205
Arg Asp Pro Glu Leu Ala Lys Trp Ile Glu Glu Asn Ala Thr Phe Pro		
210	215	220
Asn Gly Met Val Asp Arg Ile Thr Pro Thr Val Ser Ala Glu Ile Ala		
225	230	235
Lys Lys Leu Asn Ala Ala Ser Gly Leu Asp Asp Asp Leu Pro Leu Val		
245	250	255

Ala Glu Asp Phe His Gln Trp Val Leu Glu Asp Gln Phe Ala Asp Gly
 260 265 270

Arg Pro Pro Leu Glu Lys Ala Gly Val Gln Met Val Gly Asp Val Thr
 275 280 285

Asp Trp Glu Tyr Val Lys Ile Arg Met Leu Asn Ala Gly His Val Met
 290 295 300

Leu Cys Phe Pro Gly Ile Leu Val Gly Tyr Glu Asn Val Asp Asp Ala
 305 310 315 320

Ile Glu Asp Ser Glu Leu Leu Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu Asn Lys
 325 330 335

Asp Val Ile Pro Thr Leu Lys Ala Pro Ser Gly Met Thr Leu Glu Gly
 340 345 350

Tyr Arg Asp Ser Val Ile Ser Arg Phe Ser Asn Lys Ala Met Ser Asp
 355 360 365

Gln Thr Leu Arg Ile Ala Ser Asp Gly Cys Ser Lys Val Gln Val Phe
 370 375 380

Trp Thr Glu Thr Val Arg Arg Ala Ile Glu Asp Lys Arg Asp Leu Ser
 385 390 395 400

Arg Ile Ala Phe Gly Ile Ala Ser Tyr Leu Glu Met Leu Arg Gly Arg
 405 410 415

Asp Glu Lys Gly Gly Thr Tyr Glu Ser Ser Glu Pro Thr Tyr Gly Asp
 420 425 430

Ala Glu Trp Lys Leu Ala Lys Ala Asp Asp Phe Glu Ser Ser Leu Lys
 435 440 445

Leu Pro Ala Phe Asp Gly Trp Arg Asp Leu Asp Thr Ser Glu Leu Asp
 450 455 460

Gln Lys Val Ile Val Leu Arg Lys Ile Ile Arg Glu Lys Gly Val Lys
 465 470 475 480

Ala Ala Ile Pro Ala

485

<210> 2
 <211> 4115
 <212> DNA
 <213> *Gluconobacter oxydans*

<220>
 <221> CDS
 <222> (537)..(1994)

<400> 2
 aagcttgcatt gccatgcaggt cgactctaga ggatccggtt ttggcagcgc tccctagatt 60
 gatgcggcgt ctgttgaccg acatgatgct ggtggcacgt gccattgcga cggggcgtgc 120
 gaccgggaac acaggcctgc tgcctttgta caaggggctg agtcatgcgc tgcgtgggct 180
 ggacacatagt tgcgaagagc agttgcgcgc aaagcagaac cagcatgaac agcagtccga 240
 agacgaggaa atcctcggcc tcctaccgag attggaagag cagaccgctc ctgagatgcg 300
 ttttgtgatg tccctgttcc gcgaggatct cgaacgggct gttgggggtgc tcatgcgttc 360
 tgatgcgagt gccgcaaaag gtctctgaac aggacgtccc gcggagggca gtcagaggtc 420
 gaaatggctc ctgttgaaac cgtcattcgg tttttacgtt gtttcggggc tatgatggca 480
 catgcccggc cttgtcggtc cccgtcagcg accggcccga aaccacggag aattcc atg 539

Met

1

att acg cgc gaa acc ctt aag tct ctt cct gcc aat gtc cag gct ccc 587

Ile Thr Arg Glu Thr Leu Lys Ser Leu Pro Ala Asn Val Gln Ala Pro

5

10

15

ccc tat gac atc gac ggg atc aag cct ggg atc gtg cat ttc ggt gta 635

Pr Tyr Asp Ile Asp Gly Ile Lys Pro Gly Ile Val His Phe Gly Val

20

25

30

ggt aac ttt ttt cga gcc cat gag gcg ttc tac gtc gag cag att ctt 683
 Gly Asn Phe Phe Arg Ala His Glu Ala Phe Tyr Val Glu Gln Ile Leu
 35 40 45
 gaa cac gct ccg gac tgg gcg att gtt ggt gtt ggc ctg acg ggc agt 731
 Glu His Ala Pro Asp Trp Ala Ile Val Gly Val Gly Leu Thr Gly Ser
 50 55 60 65
 gac cgt tca aag aaa aaa gcc gag gaa ttc aag gcc cag gac tgc ctg 779
 Asp Arg Ser Lys Lys Lys Ala Glu Glu Phe Lys Ala Gln Asp Cys Leu
 70 75 80
 tat tcc ctg acc gag acg gct ccg tcc ggc aag agc acg gtg cgc gtc 827
 Tyr Ser Leu Thr Glu Thr Ala Pro Ser Gly Lys Ser Thr Val Arg Val
 85 90 95
 atg ggc gcg ctg cgt gac tat ctg ctt gcc ccg gcc gat ccg gaa gcc 875
 Met Gly Ala Leu Arg Asp Tyr Leu Leu Ala Pro Ala Asp Pro Glu Ala
 100 105 110
 gtg ctg aag cat ctt gtt gat ccg gcc atc cgc atc gtt tcc atg acg 923
 Val Leu Lys His Leu Val Asp Pro Ala Ile Arg Ile Val Ser Met Thr
 115 120 125
 atc acg gaa ggc ggc tac aac atc aac gag acg acc ggt gcg ttc gat 971
 Ile Thr Glu Gly Gly Tyr Asn Ile Asn Glu Thr Thr Gly Ala Phe Asp
 130 135 140 145
 ctg gag aat gcg gca gta aag gcc gac ctc aag aac ccg gaa aag ccg 1019
 Leu Glu Asn Ala Ala Val Lys Ala Asp Leu Lys Asn Pro Glu Lys Pro
 150 155 160
 tct acc gtt ttc ggt tac gtg gtc gag gcc ctg cgt cgt cgt tgg gat 1067
 Ser Thr Val Phe Gly Tyr Val Val Glu Ala Leu Arg Arg Arg Trp Asp
 165 170 175
 gcc ggt ggt aag gca ttt acg gtc atg tcc tgt gat aac ctg cgt cat 1115
 Ala Gly Gly Lys Ala Phe Thr Val Met Ser Cys Asp Asn Leu Arg His

180	185	190	
aac ggc aat gtc gcc cgc aag gcc ttc ctc ggc tat gcg aag gcg cgc			1163
Asn Gly Asn Val Ala Arg Lys Ala Phe Leu Gly Tyr Ala Lys Ala Ala			
195	200	205	
gat ccg gag ttg gcg aag tgg att gag gaa aac gcg acc ttc ccg aac			1211
Asp Pro Glu Leu Ala Lys Trp Ile Glu Glu Asn Ala Thr Phe Pro Asn			
210	215	220	225
gga atg gtt gat cgc atc acc ccg acc gtt tcg gcg gaa atc gcc aag			1259
Gly Met Val Asp Arg Ile Thr Pro Thr Val Ser Ala Glu Ile Ala Lys			
230	235	240	
aag ctc aac gcg gcc agt ggg ctg gat gac gac ctg ccg ctg gtg gcc			1307
Lys Leu Asn Ala Ala Ser Gly Leu Asp Asp Asp Leu Pro Leu Val Ala			
245	250	255	
gag gat ttc cat cag tgg gtg ctg gaa gac cag ttt gcg gat ggc cgt			1355
Glu Asp Phe His Gln Trp Val Leu Glu Asp Gln Phe Ala Asp Gly Arg			
260	265	270	
ccg ccg ctt gaa aaa gcc ggc gtg cag atg gtc ggg gac gtg acg gac			1403
Pro Pro Leu Glu Lys Ala Gly Val Gln Met Val Gly Asp Val Thr Asp			
275	280	285	
tgg gag tac gtc aag atc cga atg ctc aat gca ggg cat gtc atg ctc			1451
Trp Glu Tyr Val Lys Ile Arg Met Leu Asn Ala Gly His Val Met Leu			
290	295	300	305
tgc ttc cca ggc att ctg gtc ggc tat gag aat gtg gat gac gcc att			1499
Cys Phe Pro Gly Ile Leu Val Gly Tyr Glu Asn Val Asp Asp Ala Ile			
310	315	320	
gaa gac agc gaa ctc ctt ggc aat ctg aag aac tat ctc aac aag gat			1547
Glu Asp Ser Glu Leu Leu Gly Asn Leu Lys Asn Tyr Leu Asn Lys Asp			
325	330	335	
gtc atc ccg acc ctg aag gcg cct tca ggc atg acg ctc gaa ggc tat			1595

Val Ile Pro Thr Leu Lys Ala Pr Ser Gly Met Thr Leu Glu Gly Tyr
 340 345 350
 cgg gac agc gtc atc agc cgt ttc tcc aac aag gcg atg tcg gac cag 1643
 Arg Asp Ser Val Ile Ser Arg Phe Ser Asn Lys Ala Met Ser Asp Gln
 355 360 365
 acg ctc cgg att gct agc gat ggc tgt tcc aag gtt cag gtg ttc tgg 1691
 Thr Leu Arg Ile Ala Ser Asp Gly Cys Ser Lys Val Gln Val Phe Trp
 370 375 380 385
 acg gaa acc gtg cgt cgg gcg atc gaa gac aag cgg gac ctg tca cgt 1739
 Thr Glu Thr Val Arg Arg Ala Ile Glu Asp Lys Arg Asp Leu Ser Arg
 390 395 400
 ata gcg ttc gga att gca tcc tat ctc gaa atg ctg cgt ggt cgc gac 1787
 Ile Ala Phe Gly Ile Ala Ser Tyr Leu Glu Met Leu Arg Gly Arg Asp
 405 410 415
 gag aag ggc ggg acg tat gaa tcg tcc gag ccg act tat ggc gac gcc 1835
 Glu Lys Gly Gly Thr Tyr Glu Ser Ser Glu Pro Thr Tyr Gly Asp Ala
 420 425 430
 gaa tgg aag ttg gcc aag gcg gac gac ttc gaa agc tct ctg aag ctc 1883
 Glu Trp Lys Leu Ala Lys Ala Asp Asp Phe Glu Ser Ser Leu Lys Leu
 435 440 445
 ccg gcg ttc gat ggg tgg cgc gat ctg gat acg tcc gaa ctg gat caa 1931
 Pro Ala Phe Asp Gly Trp Arg Asp Leu Asp Thr Ser Glu Leu Asp Gln
 450 455 460 465
 aag gtc atc gtg ctg cgg aag atc atc cgc gaa aag ggc gta aaa gcc 1979
 Lys Val Ile Val Leu Arg Lys Ile Ile Arg Glu Lys Gly Val Lys Ala
 470 475 480
 gcc atc ccg gcc tga attcggcttt tagggtagcg actgaaacag aaaaccgcgc 2034
 Ala Ile Pro Ala
 485

tctggaagga gcgcggtttt ttttatgctc agatctgtcc catcaggaca aggatcacga 2094
cgaccacgat caggacaagt ccgctggagg gggagcccca tttcgaactg tacggccatg 2154
acggcagcgc accgagatca ggattacaag aaggatcagt cccatggcac atctctcttg 2214
ccggttgaga ctggtctgtg ttccgggtgt ctaaaaagt tccgtagggg cgcgaaagat 2274
caaagctgtc ggtcgcgctt aatccggtcc caagccgcat tgatgcgggc cacccggtcc 2334
tgtgcgcgtt tgcgctctgt ctctgacata ggtttctggg ccagcacgtc cggatgatgt 2394
tcgcggatca gggcgcgcca gcgcacgcgg atttctgtgt cagttgcgct gcgggtgatg 2454
ccgagaatac gataggcatc cggctcgttt ccgctggcgg cgcgattgtt gccgctttcg 2514
gccccgtccc atgctcctgg cggcaggcca aatgccccgt gaacgcgctg cagaaaatcg 2574
atttccttcg ggtgaagctc gcggctgggg ccggcatcgg cacgggcat acggaacagt 2634
gccgtcatga ggttctcaag cggcgccgta ttatcggcat aggccttgcc catttcgcgg 2694
gcatacatct cgaaatcgtc cgtccggtcg cgggcgcgat cgaacagcat gccgacttcc 2754
ttggtgttat cgggggggaa ctggaagcag gtcttgaaag cgttgatttc gtgtcggttc 2814
accggccccgt cgatcttcgc cagcttcgcg cacagggcaa caaggccgat ggcgtaaagc 2874
tgatctcgtt tgcccagggc cgcagcaatc ttggcagcgc cgaaaaaggc cgcgctgttg 2934
ggatcgggac ggccattcgc gggaaagcgc tctctccagc cggccgttga gggcttgagt 2994
agcgaaccgt tatcggcggc atgccccagc gctgcgcca tcagtgtctc gaaaggacca 3054
ccaaccgca agcccgcgac accaccgaac atcttgcccc agatagccat gtcacaaacc 3114
tagcacgccc gctcacagcg gcaaatgaca gatcgcaggc taggtgtagg tgctgatgcg 3174
ccaaccgccc gggcttgagg tgtggtagaa gctaggagtt acgaacttat cgctgtctca 3234
tgcttttgag gcgcaggttc ttctgttcgt tcatgacgg atatttttat gccaccttg 3294
atccagactg ctacttcgat cctttccgc tctgatgacg aactgatgga tcttttgatc 3354
aagcgtctgc caatgtggct gcagaaagt ctgaactggt tcggggaagc ggatcataaa 3414
tgggttcgga ttccggcggg cgtgctgttc atgctgggcg gcgttctgtc catcctgcct 3474
gttctgggtc tgtggatgct gccggtcggc gtgatgttgc ttgcgcagga tattccgttc 3534
ttccgtcgcc ttcagggccg cctcttgccg tggatcgaac gtcaacatcc ggattggctg 3594
ggccttcggc cgaaaagcgg cagaagctaa ccgttcgtct ggacgtgttt ctgaagatgt 3654
gtcagtgtc caaccgcag ggctgaagcc agtgggcgct ctggtggtcg cgcggcatcg 3714
agagaagcca ccagagacgc aaagctctgc tggcggactg cggccatcgc gtccagtata 3774

gccagaact cgggttccag tgccacggac gtccggtgtc ctgacagaga caggctgcgt 3834
 ttgacgagat cactcattcc ggttgtttct caaggcgctt caaagcccat tgtgcggttt 3894
 cggaacatc aggggtccgga tcactcagca gctcccgcgc agaagatata agcgacggat 3954
 cggccgagtt gccgatcgcg atcaggacag ttacgtacga accggttgcg tccaatccgt 4014
 ttgaccggag agccagaaaa aaacgtccgg aatgtcgcat tatccagccg caccagttcg 4074
 tcgagttttg gtgcaatcag ctccgggcgg gcctgaagct t 4115

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
 DNA of pUCP19-HC.

<400> 3

gctgctgagt gatccg 16

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
 DNA of pUCP19-HC.

<400> 4

gactgctact tcgatcc 17

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

**<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
DNA of pUCP19-HC.**

<400> 5

cctacaccta gcctgc 16

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

**<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
DNA of pUCP19-HC.**

<400> 6

cagtgccgtc atgagg 16

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
DNA of pUCP19-HC.

<400> 7

tcctgatctc ggtgcg 16

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
DNA of pUCP19-HC.

<400> 8

gatgcttcag cacggc 16

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
DNA of pUCP19-HC.

<400> 9

gacgatcacg gaaggc 16

<210> 10

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
DNA of pUCP19-HC.

<400> 10

ggttacgtgg tcgacg 16

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
DNA of pUCP19-HC.

<400> 11

ctatacctga caggtcc 17

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
DNA of pUCP19-HC.

<400> 12

gcgcgatctg gatacg 16

<210> 13

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for sequencing insert
DNA of pUCP19-HC.

<400> 13

cgaggatctc gaacgg 16

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sense primer for amplifying

DNA sequence encoding His-tagged SLDH and promoter.

<400> 14

cggattgcta gcgatggc 18

<210> 15

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as antisense primer for
amplifying DNA sequence encoding His-tagged SLDH and promoter.

<400> 15

atcgaggatc ctcaatgatg atgatgatga tgggccggga tggcggc 47

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sense primer for amplifying
DNA sequence of 3' non-coding region of SLDH gene.

<400> 16

atcgaggatc cattcggctt ttagggtagc 30

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as antisense primer for
amplifying DNA sequence of 3' non-coding region of SLDH gene.

<400> 17

tagctgagct catgggacag atctgagc 28

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Gluconobacter oxydans

<220>

<223> N-terminal amino acid sequence of SLDH.

<400> 18

Met Ile Thr Arg Glu Thr Leu Lys Ser Leu

1

5

10

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (sense) for introducing Ssp I restriction site into 5' upstream region of SLDH coding sequence.

<400> 19

taggaatatt tctcatgatt acgcgcgaaa ccc 33

<210> 20

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (antisense) for introducing Ssp I restriction site into 5' upstream region of SLDH coding sequence.

<400> 20

gatgcttcag cacggc 16

【図面の簡単な説明】

【図 1】

Ｌ-アスコルビン酸合成の反応スキームを示す図である。図中、Rはアルキル基を表す。

【図 2】

プラスミド pUCP 19-B 7 S X 2 および pUCP 19-HC の DNA インサート部分の制限酵素地図、並びに pUCP 19-HC の DNA インサート部分のシーケンス・ストラテジーを示す図である。

【図 3】

プラスミドpUCP19-SLDHの遺伝子地図を示す図である。

【図4】

発現ベクターpSDH-tufB1-Eco-d9Uの遺伝子地図を示す図である。

【図5】

発現ベクターpBBR(Km)-SDH・SNDHの遺伝子地図を示す図である。

【図6】

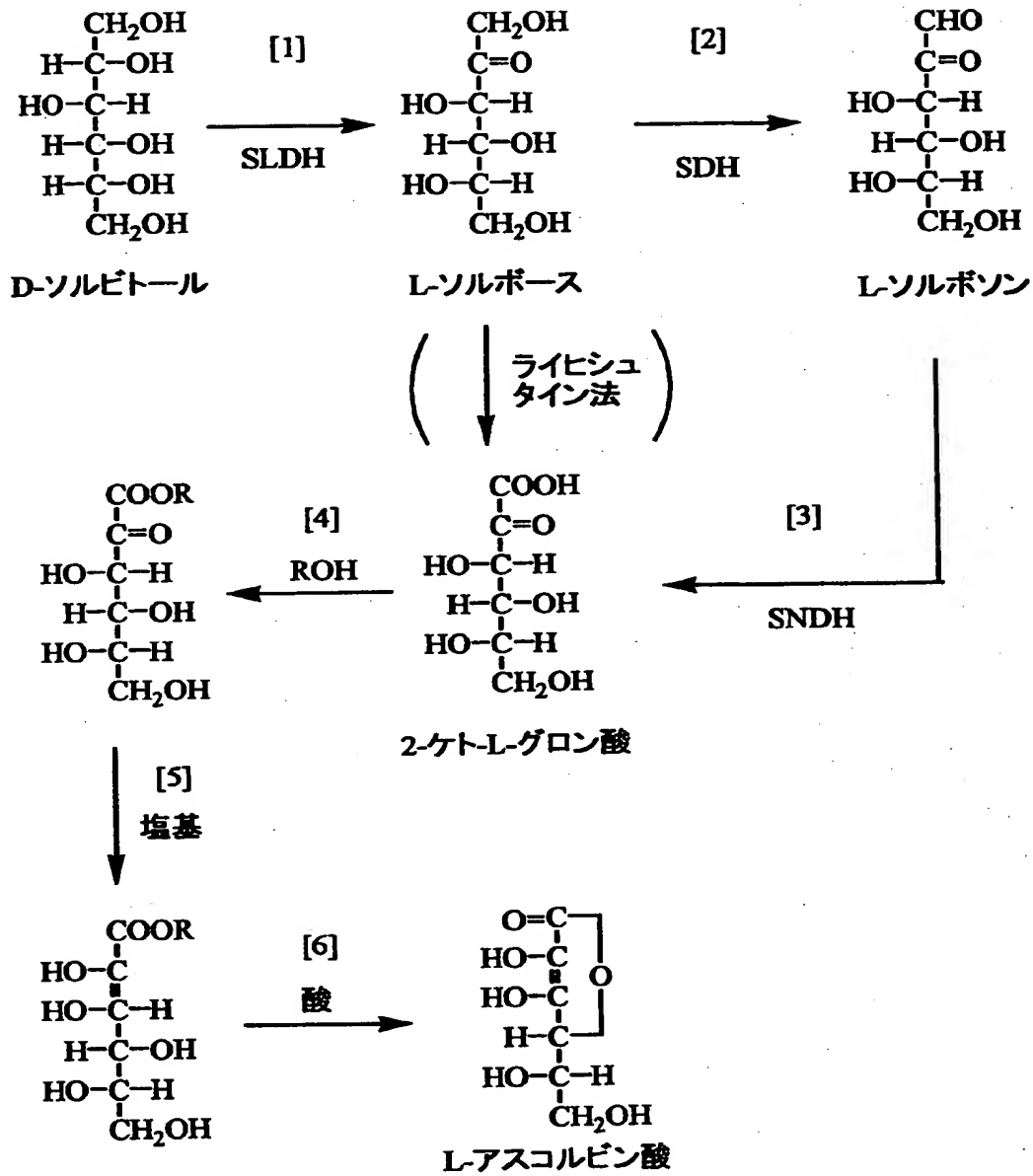
発現ベクターpBBR(Tc)-SDH・SNDHの遺伝子地図を示す図である。

【図7】

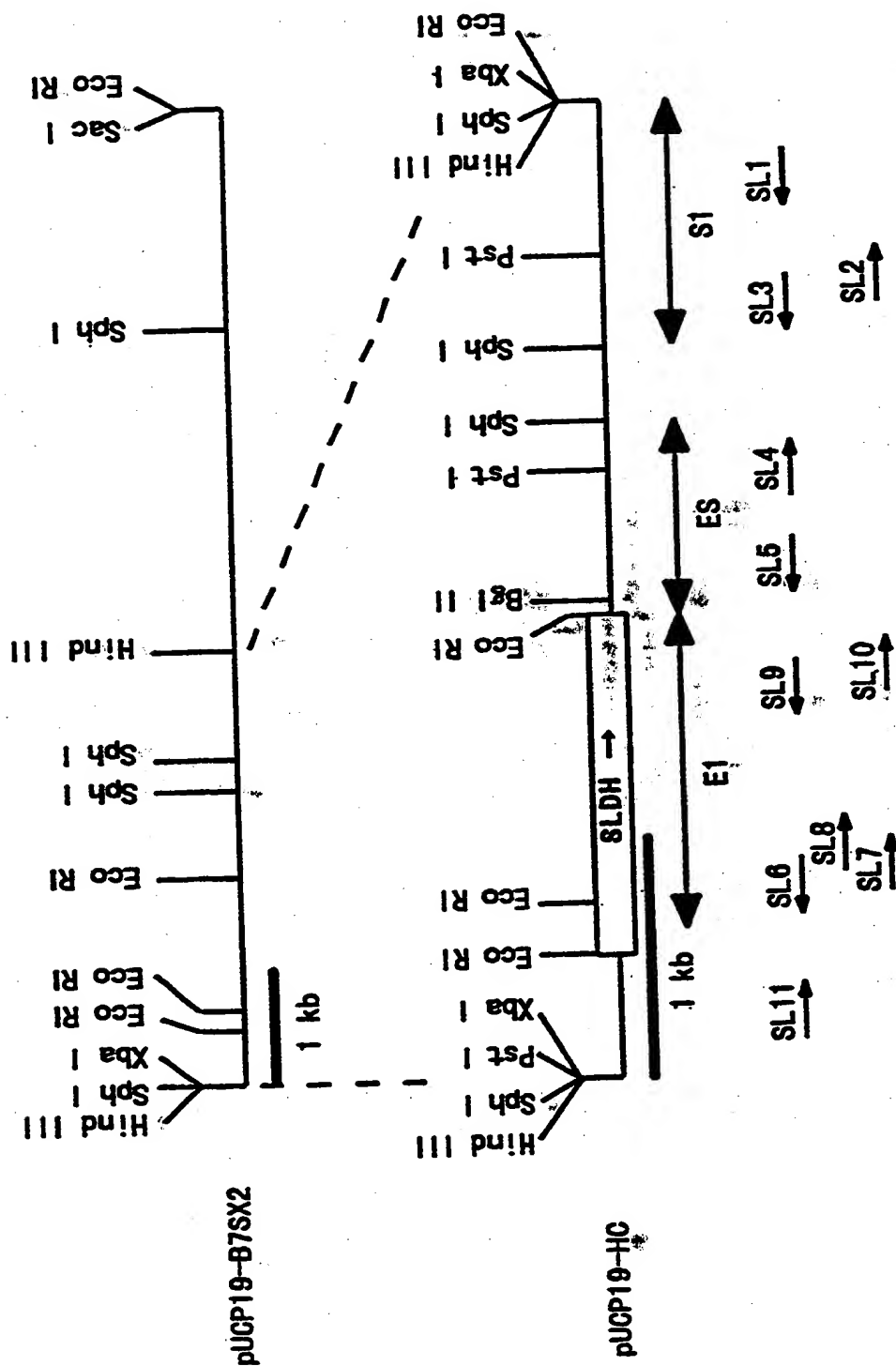
発現ベクターpUCP19-SDH・SNDHの遺伝子地図を示す図である。

【書類名】 図面

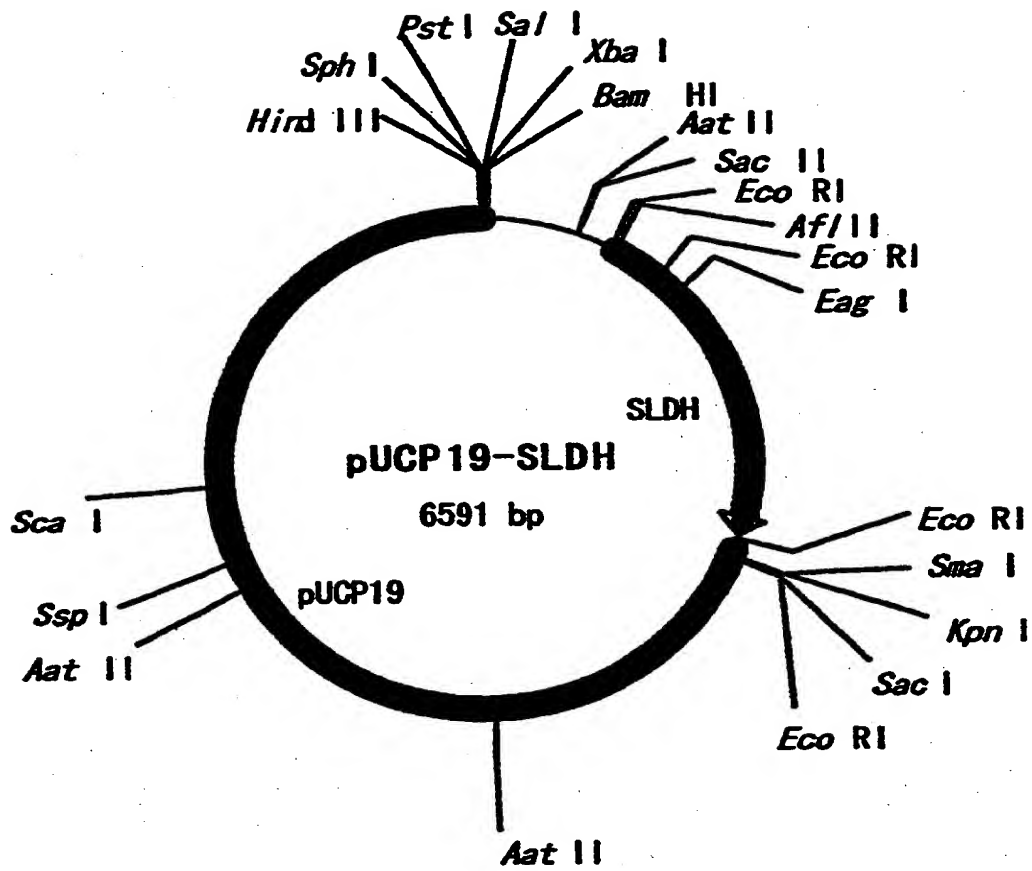
【図 1】



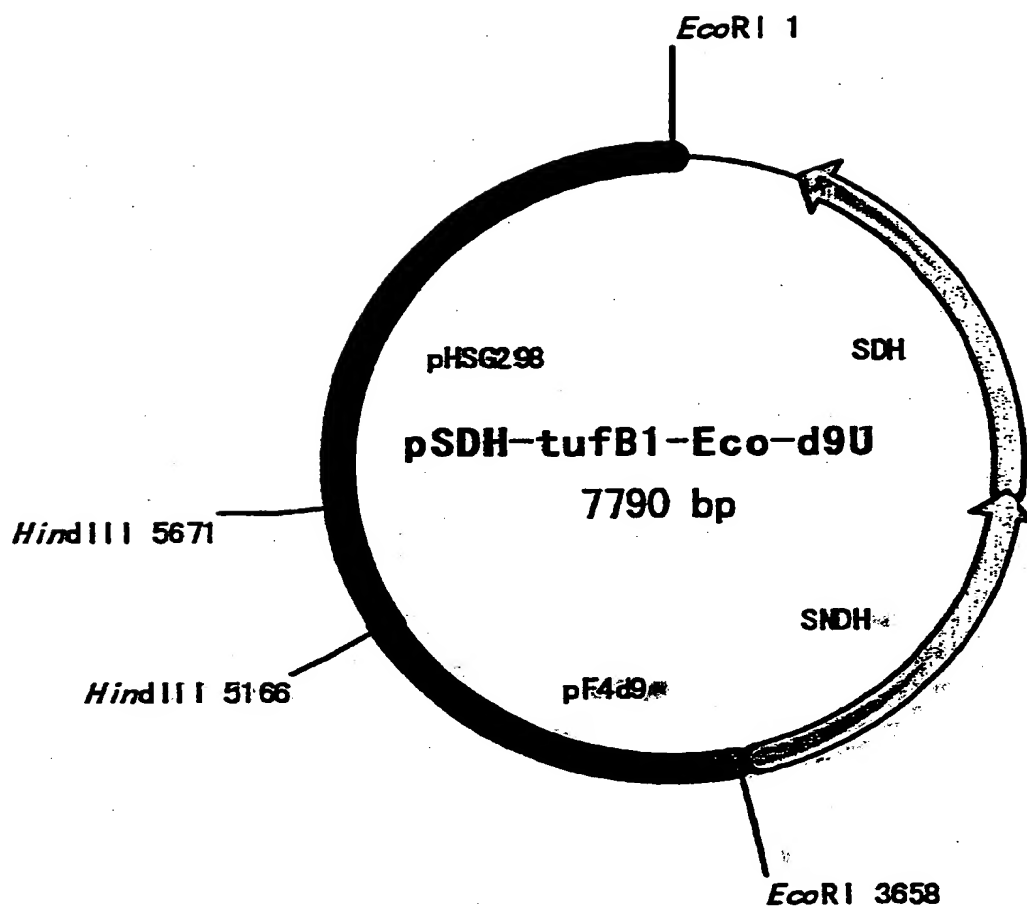
【図 2】



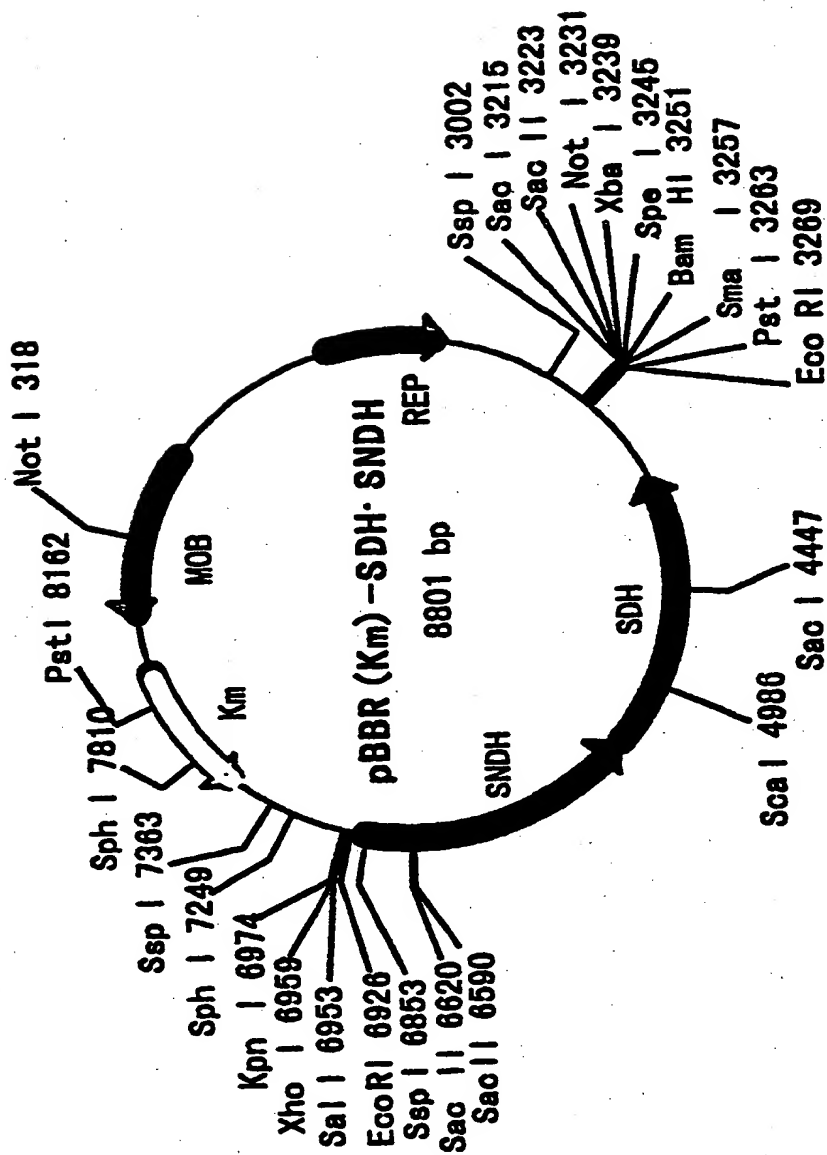
【図 3】



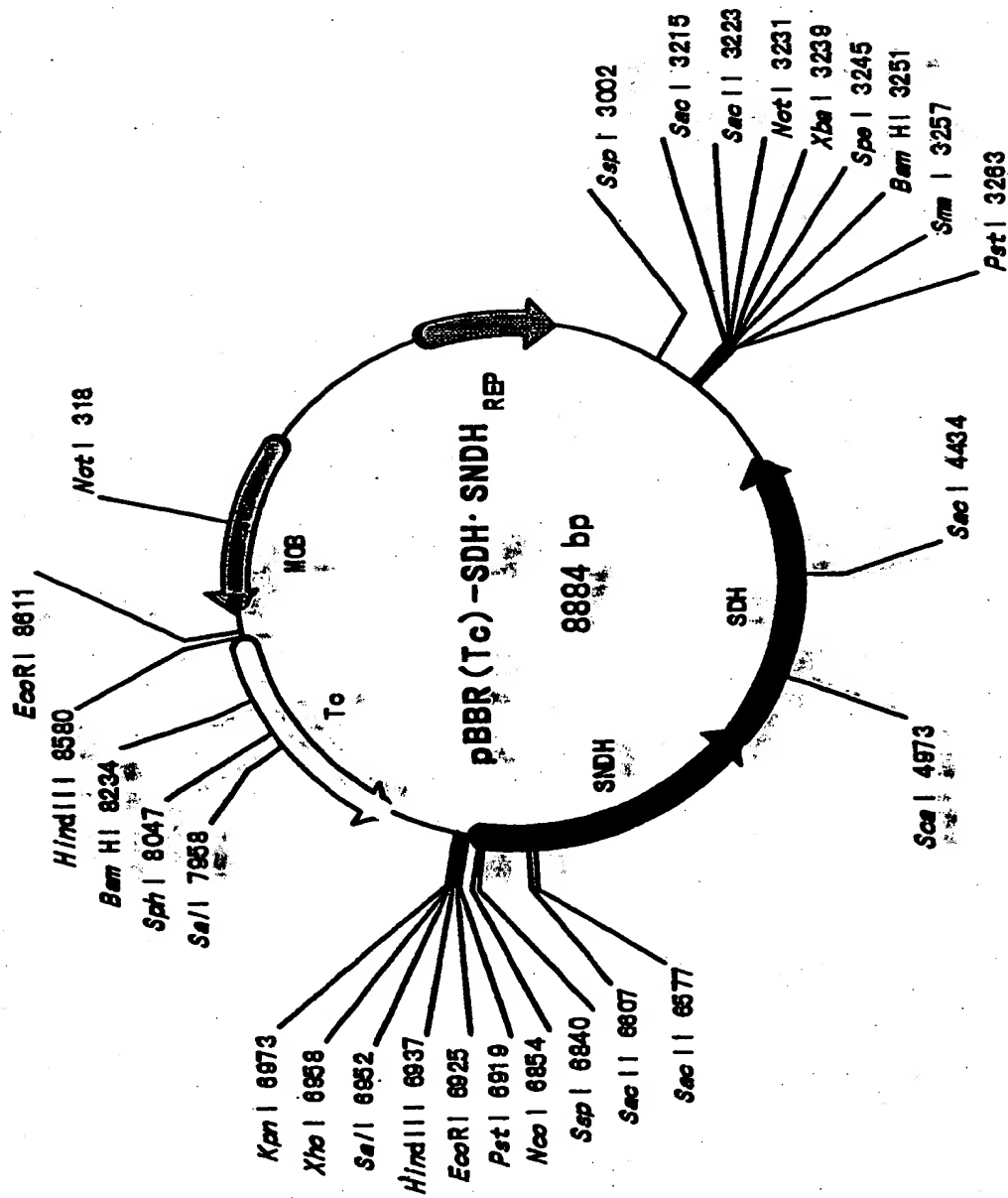
【図 4】



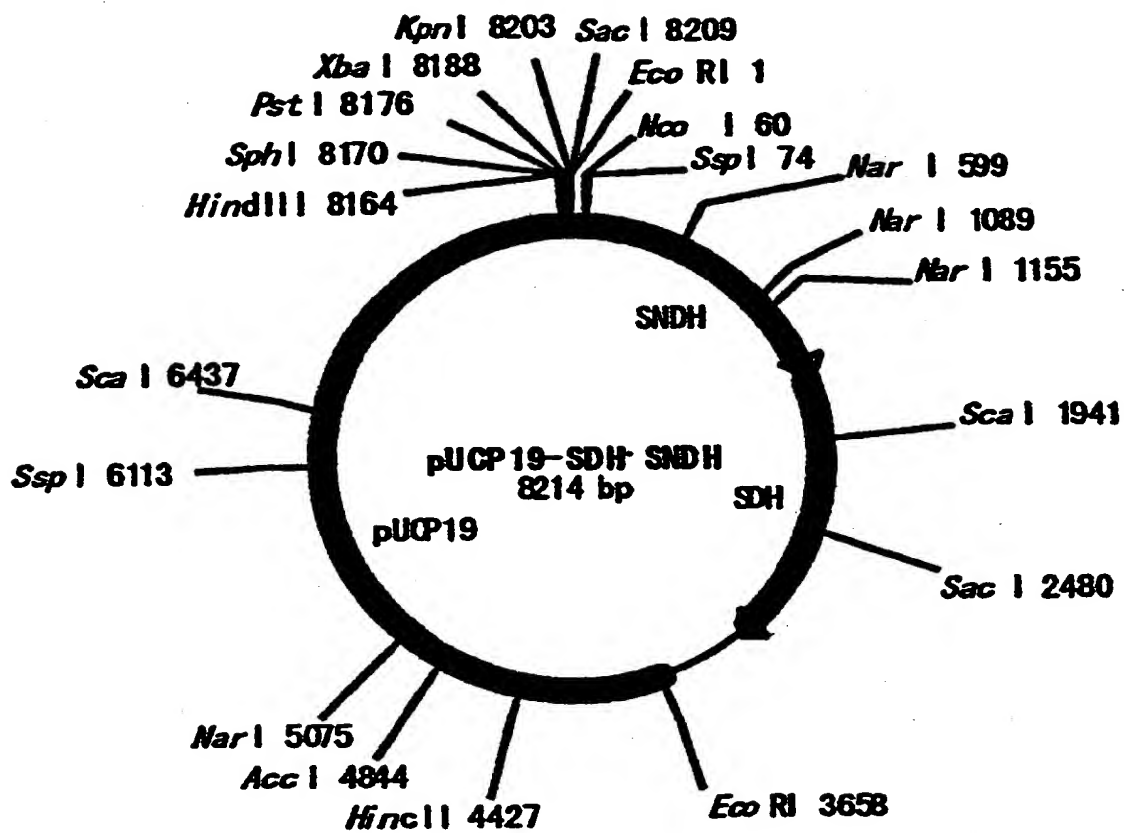
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 D-ソルビトールデヒドロゲナーゼ (SLDH) をコードする遺伝子、該遺伝子を発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することによる SLDH の製造方法、ならびに該培養物を用いた L-ソルボースまたは 2-ケト-L-グロン酸の製造方法。

【効果】 本発明によれば、L-アスコルビン酸の前駆物質である 2 K L G A を簡単に且つ効率よく発酵生産することができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005245]

1. 変更年月日	1990年 8月17日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号
氏 名	藤沢薬品工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)